

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

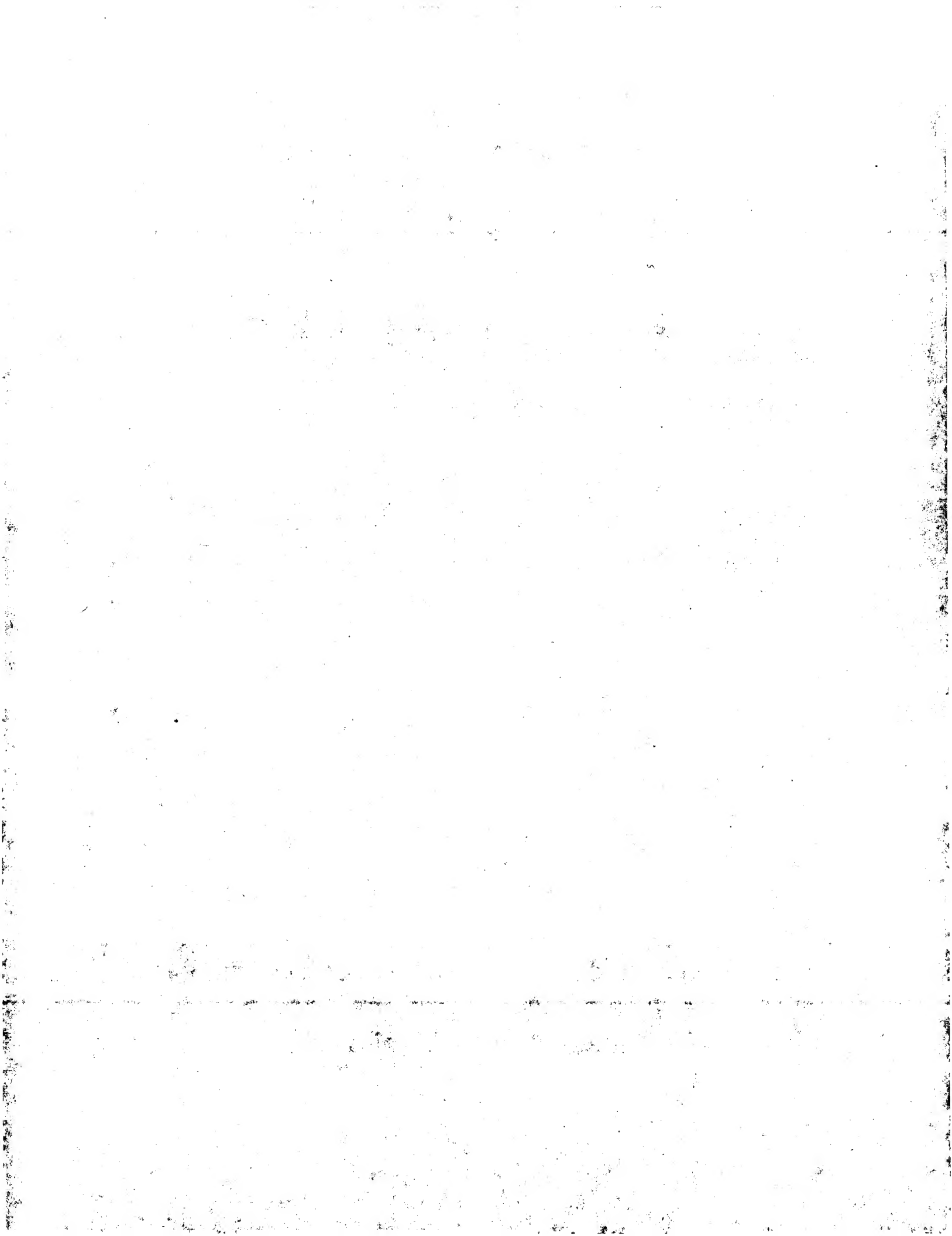
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 7/02, 15/86	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/00524 (43) Date de publication internationale: 8 janvier 1998 (08.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01107 (22) Date de dépôt international: 20 juin 1997 (20.06.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/08164 1er juillet 1996 (01.07.96) FR 60/026,667 25 septembre 1996 (25.09.96) US (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BLANCHE, Francis [FR/FR]; 41, rue des Solitaires, F-75019 Paris (FR). GUILLAUME, Jean-Marc [FR/FR]; 42, rue Saint-Maur, F-75011 Paris (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING RECOMBINANT ADENOVIRUS (54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS (57) Abstract <p>The invention concerns a method for producing recombinant adenovirus by which viral DNA is introduced in a packaging cell culture and the viruses produced are harvested after liberation in the supernatant. The invention also concerns the viruses produced and their use.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne un procédé pour la production d'adénovirus recombinants selon lequel l'ADN viral est introduit dans une culture de cellules d'encapsulation et les virus produits sont récoltés après libération dans le surnageant. Elle concerne également les virus produits et leur utilisation.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE PRODUCTION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

La présente invention concerne un nouveau procédé pour la production d'adénovirus recombinants. Elle concerne également les préparations virales purifiées produites selon ce procédé.

5 Les adénovirus présentent certaines propriétés particulièrement avantageuses pour une utilisation comme vecteur de transfert de gènes en thérapie génique. Notamment, ils ont un spectre d'hôte assez large, sont capables d'infecter des cellules quiescentes, ne s'intègrent pas au génome de la cellule infectée, et n'ont pas été associés à ce jour à des pathologies importantes chez l'homme. Les adénovirus ont
10 ainsi été utilisés pour transférer des gènes d'intérêt dans le muscle (Ragot et al., Nature 361 (1993) 647), le foie (Jaffe et al., Nature genetics 1 (1992) 372), le système nerveux (Akli et al., Nature genetics 3 (1993) 224), etc.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 (kilobases) kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée
15 répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs. Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 notamment sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement
20 séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genebank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées.

Pour leur utilisation en thérapie génique, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes thérapeutiques. Dans
25 chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de réplication dans la cellule infectée. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés de la région E1, essentielle à la réplication virale, au niveau de laquelle sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero

et al., Gene 101 (1991) 195 ; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Par ailleurs, pour améliorer les propriétés du vecteur, il a été proposé de créer d'autres délétions ou modifications dans le génome de l'adénovirus. Ainsi, une mutation ponctuelle thermosensible a été introduite dans le mutant ts125, permettant d'inactiver la protéine de 72kDa de liaison à l'ADN (DBP) (Van der Vliet et al., 1975). D'autres vecteurs comprennent une deletion d'une autre région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale, la région E4. La région E4 est en effet impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Des vecteurs adénoviraux dans lesquels les régions E1 et E4 sont délétées possèdent donc un bruit de fond de transcription et une expression de gènes viraux très réduits. De tels vecteurs ont été décrits par exemple dans les demandes WO94/28152, WO95/02697, PCT/FR96/00088). En outre, des vecteurs portant une modification au niveau du gène IVa2 ont également été décrits (WO96/10088).

Les adénovirus recombinants décrits dans la littérature sont produits à partir de différents sérotypes d'adénovirus. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Plus particulièrement, les adénovirus recombinants peuvent être d'origine humaine ou animale. Concernant les adénovirus d'origine humaine, on peut citer préférentiellement ceux classés dans le groupe C, en particulier les adénovirus de type 2 (Ad2), 5 (Ad5), 7 (Ad7) ou 12 (Ad12). Parmi les différents adénovirus d'origine animale, on peut citer préférentiellement les adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. D'autres adénovirus d'origine animale sont cités notamment dans la demande WO94/26914 incorporée à la présente par référence.

Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, l'adénovirus recombinant est un adénovirus humain du groupe C. De manière plus préférentielle, il s'agit d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.

Les adénovirus recombinants sont produits dans une lignée d'encapsidation, c'est-à-dire une lignée de cellules capables de compléter en trans une ou plusieurs des fonctions déficientes dans le génome adénoviral recombinant. L'une de ces lignées est par exemple la lignée 293 dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus a été
5 intégrée. Plus précisément, la lignée 293 est une lignée de cellules embryonnaires humaines de rein contenant l'extrémité gauche (environ 11-12 %) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation, la région E1, incluant E1a et E1b, la région codant pour la protéine pIX et une partie de la région codant pour la protéine pIVa2. Cette lignée est capable de trans-
10 compléter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, et de produire des stocks viraux ayant des titres élevés. Cette lignée est également capable de produire, à température permissive (32°C), des stocks de virus comportant en outre la mutation E2 thermosensible. D'autres lignées cellulaires capables de compléter la région E1 ont été décrites,
15 basées notamment sur des cellules de carcinome de poumon humain A549 (WO94/28152) ou sur des rétinoblastes humains (Hum. Gen. Ther. (1996) 215). Par ailleurs, des lignées capables de trans-complémenter plusieurs fonctions de l'adénovirus ont également été décrites. En particulier, on peut citer des lignées complétant les régions E1 et E4 (Yeh et al., J. Virol. 70 (1996) 559 ; Cancer Gen. Ther. 2 (1995) 322
20 ; Krougliak et al., Hum. Gen. Ther. 6 (1995) 1575) et des lignées complétant les régions E1 et E2 (WO94/28152, WO95/02697, WO95/27071).

Les adénovirus recombinants sont habituellement produits par introduction de l'ADN viral dans la lignée d'encapsidation, suivie d'une lyse des cellules après environ 2 ou 3 jours (la cinétique du cycle adénoviral étant de 24 à 36 heures). Après la lyse des
25 cellules, les particules virales recombinantes sont isolées par centrifugation en gradient de chlorure de césium.

Pour la mise en oeuvre du procédé, l'ADN viral introduit peut être le génome viral recombinant complet, éventuellement construit dans une bactérie (WO96/25506) ou dans une levure (WO95/03400), transfecté dans les cellules. Il peut également
30 s'agir d'un virus recombinant utilisé pour infecter la lignée d'encapsidation. L'ADN

viral peut aussi être introduit sous forme de fragments portant chacun une partie du génome viral recombinant et une zone d'homologie permettant, après introduction dans la cellule d'encapsulation, de reconstituer le génome viral recombinant par recombinaison homologue entre les différents fragments. Un procédé classique de production d'adénovirus comprend ainsi les étapes suivantes : Les cellules (par exemple les cellules 293) sont infectées en boîte de culture avec un préstock viral à raison de 3 à 5 particules virales par cellule (Multiplicity of Infection (MOI) = 3 à 5), ou transfectées avec l'ADN viral. L'incubation dure ensuite de 40 à 72 heures. Le virus est alors libéré du noyau par lyse des cellules, généralement par plusieurs cycles de décongélation successifs. Le lysat cellulaire obtenu est ensuite centrifugé à basse vitesse (2000 à 4000 rpm) et le surnageant (lysat cellulaire clarifié) est ensuite purifié par centrifugation en présence de chlorure de césium en deux étapes :

- Une première centrifugation rapide de 1,5 heure sur deux couches de chlorure de césium de densités 1,25 et 1,40 encadrant la densité du virus (1,34) de façon à séparer le virus des protéines du milieu;
- Une deuxième centrifugation en gradient plus longue (de 10 à 40 heures selon le rotor utilisé), qui constitue la véritable et unique étape de purification du virus.

Généralement, après la seconde étape de centrifugation, la bande du virus est majoritaire. On observe néanmoins deux bandes moins denses, fines, dont l'observation en microscopie électronique a montré qu'il s'agissait de particules virales vides ou cassées pour la bande la plus dense, et de sous unités virales (pentons, hexons) pour la bande la moins dense. Après cette étape, le virus est récolté par ponction à l'aiguille dans le tube de centrifugation et le césium est éliminé par dialyse ou dessalage.

Bien que les niveaux de pureté obtenus soient satisfaisants, ce type de procédé présente cependant certains inconvénients. En particulier, il est basé sur l'emploi de chlorure de césium, qui est un réactif incompatible avec une utilisation thérapeutique chez l'homme. De ce fait, il est impératif d'éliminer le chlorure de césium à l'issue de la purification. Ce procédé présente en outre certains autres inconvénients mentionnés plus loin, limitant son utilisation à une échelle industrielle.

Pour remédier a ces problèmes, il a été proposé de purifier le virus obtenu après la lyse, non pas par gradient de chlorure de césium, mais par chromatographie. Ainsi, l'article de Huyghe et al. (Hum. Gen. Ther. 6 (1996) 1403) décrit une étude de différents types de chromatographies appliquée a la purification d'adénovirus recombinaants. Cet article décrit notamment une étude de purification d'adénovirus recombinaants utilisant une chromatographie d'échange d'anions faible (DEAE). Des travaux antérieurs décrivaient déjà l'utilisation de ce type de chromatographie dans ce but (Klemperer et al., Virology 9 (1959) 536 ; Philipson L., Virology 10 (1960) 459 ; Haruna et al., Virology 13 (1961) 264). Les résultats présentés dans l'article de Huyghe et al. montrent une efficacité assez médiocre du protocole de chromatographie par échange d'ions préconisé. Ainsi, la résolution obtenue est moyenne, les auteurs indiquant que des particules de virus sont présentes dans plusieurs pics chromatographiques ; le rendement est faible (rendement en particules virales : 67 %; rendement en particules infectieuses : 49 %); et la préparation virale obtenue à la suite de cette étape chromatographique est impure. En outre, un prétraitement du virus par différentes enzymes/protéines est nécessaire. Ce même article décrit par ailleurs une étude de l'utilisation de la chromatographie de perméation de gel, démontrant une très mauvaise résolution et des rendements très faibles (15-20 %).

La présente invention décrit un nouveau procédé de production d'adénovirus recombinaants. Le procédé selon l'invention résulte de modifications des procédés antérieurs au niveau de la phase de production et/ou au niveau de la phase de purification. Le procédé selon l'invention permet maintenant d'obtenir de manière très rapide et industrialisable, des stocks de virus en quantité et de qualité très élevées.

L'un des premiers aspects de l'invention concerne plus particulièrement un procédé de préparation d'adénovirus recombinaants dans lequel les virus sont récoltés à partir du surnageant de culture. Un autre aspect de l'invention concerne un procédé de préparation d'adénovirus comprenant une étape d'ultrafiltration. Selon un autre aspect, l'invention concerne également un procédé de purification d'adénovirus recombinaants comprenant une étape de chromatographie d'échange d'anions. La présente invention décrit également un procédé amélioré de purification utilisant une chromatographie de

perméation de gel, éventuellement couplée à une chromatographie d'échange d'anions. Le procédé selon l'invention permet d'obtenir des virus de qualité élevée, en terme de pureté, de stabilité, de morphologie, et d'infectivité, avec des rendements très élevés et dans des conditions production entièrement compatibles avec les exigences industrielles et avec la réglementation concernant la production de molécules thérapeutiques.

En particulier, en terme d'industrialisation, le procédé de l'invention utilise des méthodes de traitement de surnageants de cultures éprouvées à large échelle pour des protéines recombinantes, telles que la microfiltration ou filtration profondeur, et l'ultrafiltration tangentielle. Par ailleurs, du fait de la stabilité du virus à 37°C, ce procédé permet une meilleure organisation au stade industriel dans la mesure où, contrairement à la méthode intracellulaire, le temps de récolte n'a pas besoin d'être précis à la demi-journée près. De plus, il garantit une récolte maximum du virus, ce qui est particulièrement important dans le cas des virus défectifs dans plusieurs régions. D'autre part, le procédé de l'invention permet un suivi plus facile et plus précis de la cinétique de production, directement sur des échantillons homogènes de surnageant, sans prétraitement, ce qui permet une meilleure reproductibilité des productions. Le procédé selon l'invention permet aussi de s'affranchir de l'étape de lyse des cellules. La lyse des cellules présente plusieurs inconvénients. Ainsi, il peut être difficile d'envisager de casser des cellules par des cycles de congélation-décongélation au niveau industriel. Par ailleurs, les méthodes alternatives de lyse (Dounce, X-press, sonication, cisaillement mécanique, etc) présentent des inconvénients : elles sont potentiellement génératrices d'aérosols difficiles à confiner pour des virus L2 ou L3 (niveau de confinement des virus, dépendant de leur pathogénicité ou de leur mode de dissémination), ces virus ayant par ailleurs tendance à être infectieux par voie aérienne; elles engendrent des forces de cisaillement et/ou une libération de chaleur difficiles à contrôler, et diminuant l'activité des préparations. La solution d'utiliser des détergents pour lyser les cellules demanderait à être validée et nécessiterait en outre une validation de l'élimination du détergent. Enfin, la lyse cellulaire conduit à la présence dans le milieu de nombreux débris cellulaires, qui rendent plus délicate la

purification. En terme de qualité de virus, le procédé de l'invention permet potentiellement une meilleure maturation du virus conduisant à une population plus homogène. En particulier, dans la mesure où l'empaquetage de l'ADN viral est la dernière étape du cycle viral, la lyse prématurée des cellules libère potentiellement des

5 particules vides qui, bien que non répliquatives, sont *a priori* infectieuses et à même de participer à l'effet toxique propre du virus et d'augmenter le ratio d'activité spécifique des préparations obtenues. Le ratio d'infectivité spécifique d'une préparation est défini comme le rapport du nombre total de particules virales, mesuré par des méthodes biochimiques (DO260nm, CLHP, PCR, méthodes immuno-enzymatiques, etc) sur le

10 nombre de particules virales générant un effet biologique (formation de plages de lyse sur cellules en culture en milieu solide, transduction de cellules). En pratique, pour une préparation purifiée, ce ratio est déterminé en faisant le rapport de la concentration des particules mesurée par DO à 260nm sur la concentration d'unités formant plage de la préparation. Ce ratio doit être inférieur à 100.

15 Les résultats obtenus montrent que le procédé de l'invention permet d'obtenir un virus d'une pureté au moins égale à son homologue purifié par centrifugation en gradient de chlorure de césium, en une seule étape et sans traitement préalable, en partant d'un surnageant viral concentré.

Un premier objet de l'invention concerne donc un procédé de production

20 d'adénovirus recombinants caractérisé en ce que l'ADN viral est introduit dans une culture de cellules d'encapsidation et les virus produits sont récoltés après libération dans le surnageant de la culture. Contrairement aux procédés antérieurs dans lesquels les virus sont récoltés suite à une lyse cellulaire prématurée effectuée de façon mécanique ou chimique, dans le procédé de l'invention, les cellules ne sont pas lysées

25 par l'intervention d'un facteur extérieur. La culture est poursuivie pendant une durée plus longue, et les virus sont récoltés directement dans le surnageant, après libération spontanée par les cellules d'encapsidation. Le virus selon l'invention est ainsi récupéré dans le surnageant cellulaire, alors que dans les procédés antérieurs, il s'agit d'un virus intracellulaire, plus particulièrement intranucléaire.

La demanderesse a maintenant montré que, malgré l'allongement de la durée de la culture et malgré la mise en oeuvre de volumes plus grands, le procédé selon l'invention permet de générer des particules virales en quantité élevée et de meilleure qualité. En outre, comme indiqué ci-avant, ce procédé permet d'éviter les étapes de lyse qui sont lourdes au niveau industriel et génèrent de nombreuses impuretés.

Le principe du procédé repose donc sur la récolte des virus libérés dans le surnageant. Ce procédé peut impliquer un temps de culture supérieur à celui des techniques antérieures basées sur la lyse des cellules. Comme indiqué ci-avant, le temps de récolte n'a pas à être précis à la demi-journée près. Il est essentiellement déterminé par la cinétique de libération des virus dans le surnageant de culture.

La cinétique de libération des virus peut être suivie de différentes manières. En particulier, il est possible d'utiliser des méthodes d'analyses telles que la RP-HPLC, la IE-HPLC, la PCR semi-quantitative (exemple 4.3), la coloration des cellules mortes au bleu trypan, la mesure de la libération d'enzymes intracellulaires du type LDH, la mesure des particules dans le surnageant par des appareils de type Coulter ou par diffraction de la lumière, des méthodes immunologiques (ELISA, RIA, etc) ou nephelométriques, la titration par aggrégation en présence d'anticorps, etc.

D'une manière préférée, la récolte est réalisée lorsque 50 % au moins des virus ont été libérés dans le surnageant. Le temps où 50 % des virus ont été libérés peut être aisément déterminé en réalisant une cinétique selon les méthodes décrites ci-dessus. Encore plus préférentiellement, la récolte est réalisée lorsque 70 % au moins des virus ont été libérés dans le surnageant. Il est particulièrement préféré d'effectuer la récolte lorsque 90 % au moins des virus ont été libérés dans le surnageant, c'est-à-dire lorsque la cinétique atteint un plateau. La cinétique de libération du virus repose essentiellement sur le cycle de réplication de l'adénovirus, et peut être influencée par certains facteurs. En particulier, elle peut varier selon le type de virus utilisé, et notamment selon le type de deletion effectuée dans le genome viral recombinant. En particulier, la deletion de la region E3 semble retarder la liberation du virus. Ainsi, en presence de la region E3, le virus peut etre recolte des 24-48 heures post infection. En

revanche, en l'absence de la region E3, un temps de culture supérieur semble nécessaire. A cet egard, la demanderesse a effectué des expérience de cinétique de libération d'un adenovirus deficien pour les regions E1 et E3 dans le surnageant des cellules, et montré que la libération débute 4 a 5 jours environ post-infection, et dure
5 jusqu'au jour 14 environ. La liberation atteint generalement un plateau entre le jour 8 et le jour 14, et le titre reste stable au moins 20 jours post-infection.

Préférentiellement, dans le procédé de l'invention, les cellules sont cultivées pendant une période comprise entre 2 et 14 jours. Par ailleurs, la liberation du virus peut etre induite par expression dans la cellule d'encapsidation d'une proteine, par
10 exemple virale, impliquee dans la liberation du virus. Ainsi, dans le cas de l'adenovirus, la liberation peut etre modulee par expression de la proteine Death codee par la region E3 de l'adenovirus (proteine E3-11,6K), eventuellement exprimee sous controle d'un promoteur inductible. De ce fait, il est possible de reduire le temps de liberation des virus et de recolter dans le surnageant de culture, plus de 50% des virus 24-48 heures
15 post-infection.

Pour recuperer les particules virales, le surnageant de culture est avantageusement préalablement filtré. L'adénovirus ayant une taille de 0,1µm environ (120nm), la filtration est réalisée au moyen de membranes ayant une porosité
20 suffisamment importante pour laisser passer le virus, mais suffisamment fine pour retenir les contaminants. De préférence, la filtration est réalisée au moyen de membranes ayant une porosite supérieure a 0,2µm. Selon un mode de mise en oeuvre particulièrement avantageux, la filtration est réalisée par filtrations successives sur des membranes de porosité décroissante. Des résultats particulièrement bons ont été
25 obtenus en réalisant la filtration sur des filtres profondeur de porosité décroissante 10µm, 1,0µm puis 0,8-0,2µm. Selon une autre variante préférée, la filtration est réalisée par microfiltration tangentielle sur membranes planes ou fibres creuses. On peut utiliser plus particulièrement des membranes planes Millipore ou des fibres creuses ayant une porosité comprise entre 0,2 et 0,6µm. Les résultats présentés dans

les exemples montrent que cette étape de filtration a un rendement de 100 % (aucune perte de virus n'a été observée par rétention sur le filtre ayant la plus faible porosité).

Selon un autre aspect de l'invention, la demanderesse a maintenant mis au point un procédé permettant de récolter et purifier le virus à partir du surnageant. A cet effet, le surnageant ainsi filtré (ou clarifié) est soumis à une ultrafiltration. Cette ultrafiltration permet (i) de concentrer le surnageant, les volumes impliqués étant important, (ii) d'effectuer une première purification du virus et (iii) d'ajuster le tampon de la préparation aux étapes ultérieures de préparation. Selon un mode de réalisation préféré, le surnageant est soumis à une ultrafiltration tangentielle. L'ultrafiltration tangentielle consiste à concentrer et fractionner une solution entre deux compartiments, rétentat et filtrat, séparés par des membranes de seuils de coupure déterminés, en réalisant un flux dans le compartiment rétentat du dispositif et en appliquant une pression transmembranaire entre ce compartiment et le compartiment filtrat. Le flux est généralement réalisé au moyen d'une pompe dans le compartiment rétentat du dispositif et la pression transmembranaire est contrôlée au moyen d'une vanne sur la veine liquide du circuit rétentat ou d'une pompe à débit variable sur la veine liquide du circuit filtrat. La vitesse du flux et la pression transmembranaire sont choisis de façon à générer peu de forces de cisaillement (nombre de Reynolds inférieur à 5000 sec^{-1} , préférentiellement inférieur à 3000 sec^{-1} , pression inférieure à 1.0 bar) tout en évitant le colmatage des membranes. Différents systèmes peuvent être utilisés pour réaliser l'ultrafiltration, comme par exemple des membranes spirales (Millipore, Amicon), membranes planes ou fibres creuses (Amicon, Millipore, Sartorius, Pall, GF, Sepracor). L'adénovirus ayant une masse de 1000 kDa environ, on utilise avantageusement dans le cadre de l'invention des membranes ayant un seuil de coupure inférieur à 1000 kDa, de préférence compris entre 100 kDa et 1000 kDa. L'utilisation de membranes ayant un seuil de coupure de 1000 kDa ou supérieur entraîne en effet une perte importante de virus à cette étape. Préférentiellement, on utilise des membranes ayant un seuil de coupure compris entre 200 et 600 kDa, encore plus préférentiellement, entre 300 et 500 kDa. Les expériences présentées dans les exemples montrent que l'emploi d'une membrane ayant un seuil de coupure à 300 kDa

permet la rétention de plus de 90% des particules virales tout en éliminant des contaminants du milieu (ADN, protéines du milieu, protéines cellulaires, etc.). L'utilisation d'un seuil de coupure de 500 kDa offre les mêmes avantages.

Les résultats présentés dans les exemples montrent que cette étape permet de
5 concentrer des volumes de surnageant importants, sans perte de virus (rendement de 90%), et qu'elle génère un virus de meilleure qualité. En particulier, des facteurs de concentration de 20 à 100 fois peuvent être obtenus aisément.

Cette étape d'ultrafiltration constitue ainsi une purification supplémentaire par rapport au schéma classique dans la mesure où les contaminants de masse inférieure au
10 seuil de coupure (300 ou 500 kDa) sont éliminés au moins en partie. L'amélioration de la qualité de la préparation virale est nette lorsque l'on compare l'aspect de la séparation après la première étape d'ultracentrifugation selon les deux procédés. Dans le procédé classique impliquant une lyse, le tube de la préparation virale présente un aspect trouble avec un coagulum (lipides, protéines) venant parfois toucher la bande
15 de virus, alors que dans le procédé de l'invention, la préparation après libération et ultrafiltration présente une bande déjà bien résolue des contaminants du milieu qui persistent dans la phase supérieure. L'amélioration de la qualité est aussi démontrée lorsque l'on compare les profils sur chromatographie d'échange d'ion d'un virus obtenu par lyse cellulaire par rapport au virus obtenu par ultrafiltration comme décrit
20 dans la présente invention. Par ailleurs, il est possible d'améliorer encore la qualité en poursuivant l'ultrafiltration par une diafiltration du concentrat. Cette diafiltration est réalisée sur le même principe que l'ultrafiltration tangentielle, et permet d'éliminer plus complètement les contaminants de taille supérieure au seuil de coupure de la membrane, tout en réalisant l'équilibration du concentrat dans le tampon de
25 purification.

Par ailleurs, la demanderesse a également montré que cette ultrafiltration permettait ensuite de purifier le virus directement par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions ou par chromatographie de perméation de gel, permettant d'obtenir
30 une excellente résolution du pic de particules virales sans avoir besoin de traitement de la préparation préalable à la chromatographie. Ceci est particulièrement inattendu et

avantageux. En effet, comme indiqué dans l'article de Hyughe et al. précité, la purification par chromatographie de préparations virales donne des résultats médiocres et nécessite de plus un prétraitement de la suspension virale par de la Benzonase et des cyclodextrines.

5 Plus particulièrement, le procédé selon l'invention est donc caractérisé en ce que les virus sont récoltés par ultrafiltration.

Comme indiqué ci-avant, le concentrat résultant est utilisable directement pour une purification du virus. Cette purification peut être réalisée par les techniques classiques antérieures, telles que la centrifugation en gradient de chlorure de césium ou
10 autre milieu d'ultracentrifugation permettant de séparer les particules selon leur taille, densité ou coefficient de sédimentation. Les résultats présentés dans l'exemple 4 montrent en effet que le virus ainsi obtenu présente des caractéristiques remarquables. En particulier, selon l'invention, il est possible de remplacer le chlorure de césium par une solution de iodixanol, 5,5'-[(2-hydroxy-1-3propanediyl)-bis(acetyl amino)]
15 bis[N,N'-bis(2,3dihydroxypropyl)-2,4,6-triiodo-1,3-benzenecarboxamide] dans laquelle le virus sédimente à l'équilibre à une densité relative comprise entre 1,16 et 1,24. L'utilisation de cette solution est avantageuse car, contrairement au chlorure de césium, elle n'est pas toxique. Par ailleurs, la demanderesse a également montré que, de manière avantageuse, le concentrat obtenu permettait aussi de purifier le virus
20 directement par un mécanisme d'échangeuse d'ions ou par perméation de gel, et d'obtenir une excellente résolution du pic chromatographique de particules virales, sans avoir besoin de prétraitement.

Selon un mode de réalisation préféré, les virus sont donc récoltés et purifiés par chromatographie d'échange d'anions.

25 Pour la chromatographie d'échange d'anions, différents types de supports peuvent être employés, tels que la cellulose, l'agarose (gels Sepharose), le dextran (gels Sephadex), l'acrylamide (gels Sephacryl, gels Trisacryl), la silice (gels TSK-gel SW), le poly[styrène-divinylbenzène] (gels Source ou gels Poros), le copolymère

éthylène glycol-méthacrylate (gels Toyopearl HW et TSK-gel PW), ou des mélanges (agarose-dextran: gel Superdex). Par ailleurs, pour améliorer la résolution chromatographique, il est préférable dans le cadre de l'invention d'utiliser de supports sous forme de billes, ayant les caractéristiques suivantes :

- 5 - le plus sphérique possible,
- de diamètre calibré (billes toutes identiques ou le plus homogènes possible), sans imperfections ni cassures,
- de diamètre le plus petit possible: des billes de 10 μm ont été décrites (MonoBeads de Pharmacia ou TSK-gel de TosoHaas, par exemple). Cette valeur
- 10 semble constituer la limite inférieure pour le diamètre de billes dont la porosité doit par ailleurs être très élevée pour permettre la pénétration des objets à chromatographier à l'intérieur des billes (voir ci-dessous).
- tout en restant rigides pour résister à la pression.

Par ailleurs, pour chromatographier les adénovirus qui constituent des objets

15 de taille très importante (diamètre > 100 nm), il est important de mettre en oeuvre des gels ayant une limite supérieure de porosité élevée, voire la plus élevée possible, pour permettre l'accès des particules virales aux groupements fonctionnels avec lesquels elles sont appelées à interagir.

Avantageusement, le support est choisi parmi l'agarose, le dextran,

20 l'acrylamide, la silice, le poly[styrène-divinylbenzène], le copolymère éthylène glycol-méthacrylate, seuls ou en mélange.

Pour la chromatographie d'échange d'anions, le support utilisé doit être fonctionnalisé, par greffage d'un groupement susceptible d'interagir avec une molécule anionique. Le plus généralement, le groupement est constitué d'une amine qui peut être

25 ternaire ou quaternaire. En utilisant une amine ternaire, telle que le DEAE par exemple, on obtient un échangeur d'anions faible. En utilisant une amine quaternaire, on obtient un échangeur d'anions fort.

Dans la cadre de la présente invention, il est particulièrement avantageux d'utiliser un échangeur d'anions fort. Ainsi, on utilise préférentiellement selon

30 l'invention un support de chromatographie tel qu'indiqué ci-dessus, fonctionnalisé par

des amines quaternaires. Parmi les supports fonctionnalisés par des amines quaternaires, on peut citer comme exemples les résines Source Q, Mono Q, Q Sepharose, Poros HQ et Poros QE, les résines de type Fractogel TMAE, et les résines Toyopearl Super Q.

5 Des exemples préférés de résines utilisables dans le cadre de l'invention sont le Source, notamment Source Q, tel que 15 Q (Pharmacia), les MonoBeads, tel que Q (Pharmacia), les résines de type Poros HQ et Poros QE. Le support MonoBeads (diamètre des billes $10 \pm 0,5 \mu\text{m}$) est disponible commercialement depuis plus de 10 ans et les résines de type Source ($15 \mu\text{m}$) ou Poros ($10 \mu\text{m}$ ou $20 \mu\text{m}$) depuis 5 ans environ. Ces deux derniers supports présentent l'avantage d'avoir une distribution des pores internes très large (ils vont de 20 nm à $1 \mu\text{m}$), permettant ainsi le passage de très gros objets à travers les billes. De plus ils offrent très peu de résistance à la circulation de liquide à travers le gel (donc très peu de pression) et sont très rigides. Le transport des solutés vers les groupements fonctionnels avec lesquels ils vont entrer en interaction est donc très rapide. La demanderesse a montré que ces paramètres sont particulièrement importants dans le cas de l'adénovirus, dont la diffusion est lente en raison de sa taille.

Les résultats présentés dans les exemples montrent que l'adénovirus peut être purifié à partir du concentrat en une seule étape de chromatographie d'échange d'anions, que le rendement de la purification est excellent (140% en terme de tdu, comparé à la valeur de 49% rapportée par Huyghes et al.) et que la résolution est excellente. En outre, les résultats présentés montrent que l'adénovirus obtenu présente une infectivité élevée, et possède donc les caractéristiques requises pour une utilisation thérapeutique. Des résultats particulièrement avantageux ont été obtenus avec un échangeur d'anions fort, c'est-à-dire fonctionnalisé par des amines quaternaires, et notamment avec la résine Source Q. La résine Source Q15 est particulièrement préférée.

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne un procédé de purification d'adénovirus recombinants à partir d'un milieu biologique caractérisé en ce qu'il comprend une étape de purification par chromatographie d'échange d'anions fort.

Selon cette variante, le milieu biologique peut être un surnageant de cellules
5 d'encapsulation productrices dudit virus, un lysat de cellules d'encapsulation productrices dudit virus, ou une solution prépurifiée dudit virus.

Préférentiellement, la chromatographie est effectuée sur un support fonctionnalisé avec une amine quaternaire. Toujours selon un mode préféré, le support est choisi parmi l'agarose, le dextran, l'acrylamide, la silice, le poly[styrène-
10 divinylbenzène], le copolymère éthylène glycol-méthacrylate, seul ou en mélange.

Un mode de réalisation particulièrement avantageux est caractérisé en ce que la chromatographie est effectuée sur une résine Source Q, de préférence Q15.

Par ailleurs, le procédé décrit ci-dessus est avantageusement réalisé à partir d'un surnageant de cellules productrices, et comprend une étape préalable
15 d'ultrafiltration. Cette étape est avantageusement réalisée dans les conditions définies ci-avant, et notamment, il s'agit d'une ultrafiltration tangentielle sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 300 et 500 kDa.

Selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, les virus sont récoltés et purifiés par chromatographie de perméation de gel.

20 La perméation de gel peut être réalisée directement sur le surnageant, sur le concentrat, ou sur le virus issu de la chromatographie d'échange d'anions. Les supports mentionnés pour la chromatographie d'échange d'anions peuvent être utilisés dans cette étape, mais sans fonctionnalisation.

A cet égard, les supports préférés sont l'agarose (gels Sepharose), le dextran
25 (gels Sephadex), l'acrylamide (gels Sephacryl, gels Trisacryl), la silice (gels TSK-gel SW), le copolymère éthylène glycol-méthacrylate (gels Toyopearl HW et TSK-gel

PW), ou des mélanges (agarose-dextran: gel Superdex). Des supports particulièrement préférés sont :

- le Superdex 200HR (Pharmacia)
- le Sephacryl S-500HR, S-1000HR ou S-2000 (Pharmacia)
- 5 - le TSK G6000 PW (TosoHaas).

Un procédé préféré selon l'invention comprend donc une ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'échange d'anions.

Un autre procédé préféré comprend une ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'échange d'anions, suivie d'une chromatographie de perméation de gel.

Une autre variante de l'invention concerne un procédé de purification d'adenovirus à partir d'un milieu biologique comprenant une première étape d'ultracentrifugation, une deuxième étape de dilution ou dialyse, et une troisième étape de chromatographie d'échange d'anions. Préférentiellement, selon cette variante, la première étape est réalisée par ultracentrifugation rapide sur gradient de chlorure de césium. Le terme rapide signifie une ultracentrifugation allant de 0,5 à 4 heures environ. Au cours de la deuxième étape, le virus est dilué ou dialysé contre du tampon, pour faciliter son injection sur le gel de chromatographie, et l'élimination du milieu d'ultracentrifugation. La troisième étape est réalisée en utilisant une chromatographie d'échange d'anions telle que décrite ci-avant, de préférence d'anions forts. Dans une expérience typique, à partir du virus récolté dans le surnageant (ou éventuellement intracellulaire), une 1ère ultracentrifugation rapide est effectuée avec chlorure de césium (comme dans l'exemple 3). Ensuite, après une simple dilution de l'échantillon (par exemple par 10 volumes de tampon) ou après une simple dialyse dans du tampon, l'échantillon est chromatographié en échange d'ions (comme dans l'exemple 5.1.). L'avantage de cette variante du procédé de l'invention, provient du fait qu'elle met en oeuvre 2 modes totalement différents de séparation du virus (densité et charge de surface), pouvant amener éventuellement le virus à un niveau de qualité combinant les performances des 2 méthodes. En outre, l'étape de chromatographie permet

simultanément d'éliminer le milieu utilisé pour l'ultracentrifugation (chlorure de césium par exemple, ou tout autre milieu équivalent cité plus haut).

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation de iodixanol, 5,5'-[(2-hydroxy-1,3-propanediyl)-bis(acetylamino)]bis[N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-triiodo-1,3-benzenecarboxamide] pour la purification d'adénovirus.

Pour la mise en œuvre du procédé de l'invention, différentes cellules d'encapsulation des adénovirus peuvent être utilisées. En particulier, les cellules d'encapsulation peuvent être préparées à partir de différentes cellules pharmaceutiquement utilisables, c'est-à-dire cultivables dans des conditions industriellement acceptables et n'ayant pas de caractère pathogène reconnu. Il peut s'agir de lignées cellulaires établies ou de cultures primaires et notamment de rétinoblastes humains, de cellules de carcinome de poumon humain, ou de cellules embryonnaires de rein. Il s'agit avantageusement de cellules d'origine humaine, infectables par un adénovirus. A cet égard, on peut citer les cellules KB, Hela, 293, Vero, gmDBP6, HER, A549, HER, etc.

Les cellules de la lignée KB sont issues d'un carcinome épidermique humain. Elles sont accessibles à l'ATCC (ref. CCL17) ainsi que les conditions permettant leur culture. La lignée de cellules humaines Hela est issue d'un carcinome de l'épithélium humain. Elle est également accessible à l'ATCC (ref. CCL2) ainsi que les conditions permettant sa culture. Les cellules de la lignée 293 sont des cellules de rein embryonnaire humain (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 (12 %). La lignée de cellules gm DBP6 (Brough et al., Virology 190 (1992) 624) est constituée de cellules Hela portant le gène E2 d'adénovirus sous le contrôle du LTR de MMTV.

Il peut s'agir également de cellules d'origine canine (BHK, MDCK, etc). A cet égard, les cellules de la lignée canines MDCK sont préférées. Les conditions de culture

des cellules MDCK ont été décrites notamment par Macatney et al., Science 44 (1988) 9.

Differentes lignées de cellules d'encapsulation ont été décrites dans la littérature et sont mentionnées dans les exemples. Il s'agit avantageusement de cellules trans-complémentant la fonction E1 de l'adénovirus. Encore plus préférentiellement, il s'agit de cellules trans-complémentant les fonctions E1 et E4 ou E1 et E2a de l'adénovirus. Ces cellules sont préférentiellement dérivées de cellules embryonnaires humaines de rein ou de la rétine, ou de carcinomes humains de poumon.

L'invention fournit ainsi un procédé de production d'adénovirus recombinants particulièrement avantageux. Ce procédé est adapté à la production de virus recombinants défectifs pour une ou plusieurs régions, et en particulier, de virus défectifs pour la région E1, ou pour les régions E1 et E4. Par ailleurs, il est applicable à la production d'adénovirus de sérotypes différents, tels qu'indiqués ci-avant.

Selon un mode particulièrement avantageux, le procédé de l'invention est utilisé pour la production d'adénovirus recombinants dans lesquels la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment PvuII-BglII allant du nucléotide 454 au nucléotide 3328, sur la séquence de l'adénovirus Ad5. Cette séquence est accessible dans la littérature et également sur base de données (voir notamment Genbank n° M73260). Dans un autre mode de réalisation préféré, la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment HinfII-Sau3A allant du nucléotide 382 au nucléotide 3446. Dans un mode particulier, le procédé permet la production de vecteurs comprenant une délétion de la totalité de la région E4. Ceci peut être réalisé par excision d'un fragment MaeII-MscI correspondant aux nucléotides 35835-32720. Dans un autre mode particulier, seule une partie fonctionnelle de E4 est délétée. Cette partie comprend au moins les phases ORF3 et ORF6. A titre d'exemple, ces phases codantes peuvent être délétées du génome sous forme de fragments PvuII-AluI et BglII-PvuII respectivement, correspondant aux nucléotides 34801-34329 et 34115-33126 respectivement. Les délétions de la région E4 du virus Ad2 dl808 ou des virus Ad5 dl1004, Ad5 dl1007, Ad5 dl1011 ou Ad5 dl1014 peuvent également être utilisées dans le cadre de

l'invention. A cet égard, les cellules de l'invention sont particulièrement avantageuses pour la production de virus comprenant une région E1 inactive et une délétion dans la région E4 du type de celle présente dans le génome de Ad5 dl1014, c'est-à-dire de virus E4⁻ conservant la phase de lecture ORF4.

5 Comme indiqué ci-avant, la délétion dans la région E1 couvre avantageusement tout ou partie des régions E1A et E1B. Cette délétion doit être suffisante pour rendre le virus incapable de réplication autonome dans une cellule. La partie de la région E1 délétée dans les adénovirus selon l'invention couvre avantageusement les nucléotides 454-3328 ou 382-3446.

10 Les positions données ci-dessus font référence à la séquence de l'adénovirus Ad5 sauvage telle que publiée et accessible sur base de donnée. Bien que des variations mineures puissent exister entre les différents sérotypes d'adénovirus, ces positions sont généralement applicables à la construction d'adénovirus recombinants selon l'invention à partir de tout sérotype, et notamment des adénovirus Ad2 et Ad7.

15 Par ailleurs, les adénovirus produits peuvent posséder d'autres altérations au niveau de leur génome. En particulier, d'autres régions peuvent être délétées pour augmenter la capacité du virus et réduire ses effets secondaires liés à l'expression de gènes viraux. Ainsi, tout ou partie de la région E3 ou IVa2 notamment peut être délétée. Concernant la région E3, il peut cependant être particulièrement avantageux
20 de conserver la partie codant pour la protéine gp19K. Cette protéine permet en effet d'éviter que le vecteur adénoviral fasse l'objet d'une réaction immunitaire qui (i) limiterait son action et (ii) pourrait avoir des effets secondaires indésirables. Selon un mode particulier, la région E3 est délétée et la séquence codant pour la protéine gp19k est réintroduite sous contrôle d'un promoteur hétérologue.

25 Comme indiqué avant, les adénovirus constituent des vecteurs de transfert de gènes très efficaces pour des applications de thérapie génique et cellulaire. Pour cela, une séquence d'acides nucléiques hétérologue dont le transfert et/ou l'expression dans une cellule, un organe ou un organisme est recherché peut être insérée dans leur

génom. Cette séquence peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques, tels qu'un gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique. Parmi les produits thérapeutiques, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (WO94/25073), la dystrophine ou une minidystrophine (WO93/06223), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (WO94/24297), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, les gènes suicides : thymidine kinase, cytosine désaminase, etc; ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou artificielle (Fab, ScFv, etc, WO94/29446), etc. Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Le gène thérapeutique peut aussi être un gène codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme une réponse immunitaire, en vue de la réalisation de vaccins. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Généralement, la séquence d'acides nucléiques hétérologue comprend également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule infectée, ainsi qu'une région située en 3' du gène d'intérêt, et qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation. L'ensemble de ces éléments constitue la cassette d'expression. Concernant la région promotrice, il peut s'agir d'une région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir

de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux ou de toute séquence promotrice ou dérivée, stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non et de façon inductible ou non. A titre d'exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter, ou du génome d'un virus, et notamment, les promoteurs des gènes E1A, MLP d'adénovirus, le promoteur CMV, LTR-RSV, etc. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut citer également les promoteurs ubiquitaires (HPRT, vimentine, α -actine, tubuline, etc), les promoteurs des filaments intermédiaires (desmine, neurofilaments, kératine, GFAP, etc) les promoteurs de gènes thérapeutiques (type MDR, CFTR, facteur VIII, etc) les promoteurs spécifiques de tissus (pyruvate kinase, villine, promoteur de la protéine intestinale de liaison des acides gras, promoteur de l'actine α des cellules du muscle lisse, promoteurs spécifiques pour le foie ; Apo AI, Apo AII, Albumine humaine etc) ou encore les promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinolique, etc.). En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire. Par ailleurs, lorsque l'acide nucléique inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence.

Par ailleurs, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

La cassette d'expression du gène thérapeutique peut être insérée en différents sites du génome de l'adénovirus recombinant, selon les techniques décrites dans l'art antérieur. Elle peut tout d'abord être insérée au niveau de la délétion E1. Elle peut

également être insérée au niveau de la région E3, en addition ou en substitution de séquences. Elle peut également être localisée au niveau de la région E4 déléetée.

La présente invention concerne également les préparations virales purifiées obtenues selon le procédé de l'invention, ainsi que toute composition pharmaceutique
5 comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs préparés selon ce procédé. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules
10 pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de
15 solutés injectables. D'autres excipients peuvent être utilisés tels que par exemple un hydrogel. Cet hydrogel peut être préparé à partir de tout polymère (homo ou hétéro) bio-compatible et non cytotoxique. De tels polymères ont par exemple été décrits dans la demande WO93/08845. Certains d'entre eux, comme notamment ceux obtenus à partir d'oxyde d'éthylène et/ou de propylène sont commerciaux. Les doses de virus
20 utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence 10^6 à 10^{10}
25 pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution d'adénovirus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Selon le gène thérapeutique, les virus ainsi produits peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies, incluant les maladies génétiques (dystrophie, fibrose kystique, etc), les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, ALS, etc), les cancers, les pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéïnémies, les pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

10 Figure 1 : Etude de la stabilité de l'adénovirus purifié selon l'exemple 4.

Figure 2 : Analyse en HPLC (phase inverse) de l'adénovirus purifié selon l'exemple 4. Comparaison avec l'adénovirus de l'exemple 3.

Figure 3 : Cinétique de libération de l'adénovirus Ad-βGal dans le surnageant de cellules 293, mesurée par PCR semi-quantitative et Plaque Assay.

15 Figure 4 : Profil d'élution sur Source Q15 d'un surnageant d'adénovirus ultrafiltré (exemple 5.1).

Figure 5 : Analyse en CLHP Ressource Q du pic de virus récolté par chromatographie sur résine Source Q15 d'un surnageant d'adénovirus ultrafiltré (exemple 5.1).

20 Figure 6 : (A) Profil d'élution sur résine Source Q15 d'un surnageant d'adénovirus Ad-APOA1 ultrafiltré (exemple 5.3); et (B) Analyse en CLHP (Ressource Q) du pic de virus récolté.

Figure 7 : (A) Profil d'élution sur Source Q15 d'un surnageant d'adénovirus Ad-TK ultrafiltré (exemple 5.3). Analyse en CLHP (Ressource Q) des différentes fractions (début et fin de pic) de virus récoltées : (B) Fraction F2, milieu du pic; (C) Fraction F3, borne du pic; (D) Fraction F4, fin du pic.

25 Figure 8 : Profil d'élution sur résine Mono Q d'un surnageant concentré de culture de cellules productrices d'adénovirus (exemple 5.4). BG25F1: Virus surnageant concentré et purifié sur césium. BG25C : Surnageant infecté, concentré.

Figure 9 : Profil d'élution sur gel POROS HQ d'un surnageant concentré de culture de cellules productrices d'adénovirus (exemple 5.4). BG25F1 : Virus surnageant concentré et purifié sur césium. BG25C : Surnageant infecté, concentré.

Figure 10 A et B : Profil de purification par perméation de gel sur Sephacryl S1000HR/Superdex 200HR d'un surnageant d'adénovirus ultrafiltré (exemple 6).

Figure 11 : Analyse en microscopie électronique d'un stock d'adénovirus purifié selon l'invention.

Figure 12 : Analyse en microscopie électronique de la bande de virus de densité 1.27.

10 Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories). Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage

T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham. L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant. La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1 : Lignées cellulaires d'encapsidation

Les cellules d'encapsidation utilisées dans le cadre de l'invention peuvent provenir de toute lignée cellulaire infectable par un adénovirus, compatible avec une utilisation à des fins thérapeutiques. Il s'agit plus préférentiellement d'une cellule choisie parmi les lignées suivantes :

- Les cellules de la lignée 293 :

La lignée 293 est une lignée de cellules embryonnaires de rein humaines contenant l'extrémité gauche (environ 11-12%) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation, la région E1, incluant E1a, E1b, la région codant pour la protéine pIX et une partie de la région codant pour la protéine pIVa2 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée est capable de trans-complémenter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, et de produire des stocks viraux ayant des titres élevés

- Les cellules de la lignée A549

Des cellules complétant la région E1 de l'adénovirus ont été construites à partir des cellules A549 (Imbler et al., Gene Ther. (1996) 75). Ces cellules contiennent un fragment restreint de la région E1, dépourvue de l'ITR gauche, placée sous le
5 contrôle d'un promoteur inducible.

- Les cellules de la lignée HER

Les cellules embryonnaires de la rétine humaine (HER) peuvent être infectées par un adénovirus (Byrd et al., Oncogene 2 (1988) 477). Des cellules d'encapsulation d'adénovirus préparées à partir de ces cellules ont été décrites par exemple dans la
10 demande WO94/28152 ou dans l'article de Fallaux et al. (Hum. Gene Ther. (1996) 215). On peut citer plus particulièrement la lignée 911 comprenant la région E1 du génome de l'adénovirus Ad5, du nucléotide 79 au nucléotide 5789 intégrée dans le génome de cellules HER. Cette lignée de cellules permet la production de virus défectifs pour la région E1.

15 - Les cellules IGRP2

Les cellules IGRP2 sont des cellules obtenues à partir de cellules 293, par intégration d'une unité fonctionnelle de la région E4 sous contrôle d'un promoteur inducible. Ces cellules permettent la production de virus défectifs pour les régions E1 et E4 (Yeh et al., J. Virol (1996) 70).

20 - Les cellules VK

Les cellules VK (VK2-20 et VK10-9) sont des cellules obtenues à partir de cellules 293, par intégration de l'intégralité de la région E4 sous contrôle d'un promoteur inducible, et de la région codant pour la protéine pIX. Ces cellules permettent la production de virus défectifs pour les régions E1 et E4 (Krougliak et al.,
25 Hum. Gene Ther. 6 (1995) 1575).

- Les cellules 293E4

Les cellules 293E4 sont des cellules obtenues à partir de cellules 293, par intégration de l'intégralité de la région E4. Ces cellules permettent la production de

virus défectifs pour les régions E1 et E4 (WO95/02697; Cancer Gene Ther. (1995) 322).

Exemple 2 : Virus utilisés

5 Les virus produits dans le cadre des exemples qui suivent sont un adenovirus contenant le gene marqueur LacZ de E.coli (Ad-βGal), un adenovirus contenant le gene codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpes type I (Ad-TK), un adenovirus contenant le gene codant pour la protéine suppresseur de tumeur p53 humaine et un virus codant pour l'apolipoprotéine A1 (Ad-apoA1). Ces virus sont
10 dérivés du serotype Ad5 et possèdent la structure suivante :

- Une deletion dans la region E1 recouvrant par exemple les nucleotides 382 (site HinfI) à 3446 (site Sau3a).

- Une cassette d'expression du gene, sous controle du promoteur RSV ou CMV, inserée au niveau de ladite deletion.

15 - Une deletion de la region E3.

La construction de ces virus a été decrite dans la litterature (WO94/25073, WO95/14102, FR 95.01632, Stratford-Perricaudet et al. J. Clin. Invest (1992) p626). Il est entendu que toute autre construction peut être produite selon le procede de l'invention, et notamment des virus portant d'autres genes heterologues et/ou d'autres
20 deletions (E1/E4 ou E1/E2 par exemple).

Exemple 3 : Production de virus par lyse des cellules

Cet exemple reproduit la technique anterieure de production de virus, consistant a lyser les cellules d'encapsulation pour recuperer les virus produits.

Les cellules 293 sont infectées à 80-90% de confluence en boite de culture
25 avec un préstock de virus Ad-βGal ou Ad-TK (exemple 2) à raison de 3 à 5 virus par cellule (Multiplicity of Infection MOI = 3 à 5). L'incubation dure de 40 à 72 heures, le timing de récolte étant jugé par l'observation au microscope des cellules qui

s'arrondissent, deviennent plus réfringentes et adhérent de plus en plus faiblement au support de culture. Dans la littérature la cinétique du cycle viral dure de 24 à 36 heures.

5 Au niveau d'une production de labo il est important de récolter les cellules avant qu'elles ne se détachent afin d'éliminer le milieu d'infection au moment de la récolte sans perdre de cellules puis de les reprendre dans un volume minimum (le facteur de concentration est selon la taille de la culture de l'ordre de 10 à 100 fois).

Le virus est alors libéré du noyau par 3 à 6 cycles de décongélation successifs (ethanol carboglace à -70°C, bain-marie à 37°C)

10 Le lysat cellulaire obtenu est ensuite centrifugé à basse vitesse (2000 à 4000 rpm) et le surnageant (lysat cellulaire clarifié) est ensuite purifié par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium en deux étapes:

- Une première ultracentrifugation (step) rapide de 1,5 heure 35000 rpm rotor sw 41, sur deux couches de césium 1.25 et 1.40 encadrant la densité du virus (1.34) de
15 façon à séparer le virus des protéines du milieu; les rotors peuvent être des rotors 'swinging' (Sw28, Sw41 Beckman) ou angle fixe (Ti 45, Ti 70, Ti 70.1 Beckman) selon les volumes à traiter;

- Une deuxième ultracentrifugation en gradient plus longue (de 10 à 40 heures selon le rotor utilisé), par exemple 18 heures à 35000 rpm en rotor sw 41 qui constitue
20 la véritable et unique purification du virus. Le virus se retrouve dans un gradient linéaire à l'équilibre à une densité de 1.34.

Généralement, à cette étape, la bande du virus est majoritaire. On observe néanmoins parfois deux bandes moins denses, fines dont l'observation en microscopie électronique a montré qu'il s'agissait de virus vides ou cassés et pour la bande la moins
25 dense de sous unités virales (pentons, hexons). Après cette étape le virus est récolté dans le tube par ponction à l'aiguille et le césium est éliminé par dialyse ou dessalage sur G25.

Exemple 4 : Production de virus dans le surnageant

Cet exemple décrit une expérience de production de virus par récupération après libération spontanée. Le virus est ensuite récolté par ultrafiltration, puis purifié par chlorure de césium.

4.1. Protocole

5 Dans cette méthode, contrairement à l'exemple 3, les cellules ne sont pas récoltées 40 à 72 heures post-infection, mais l'incubation est prolongée entre 8 à 12 jours de façon à obtenir une lyse totale des cellules sans avoir besoin de procéder aux cycles de congélations décongélations. Le virus se retrouve dans le surnageant.

Le surnageant est alors clarifié par filtration sur des filtres profondeur de
10 porosité décroissante (10 μm /1.0 μm /0.8-0.2 μm).

Le virus a une taille de 0.1 μm et à cette étape nous n'avons observé aucune perte de virus par rétention sur le filtre à la plus faible porosité (0.22 μm)

Le surnageant une fois clarifié est ensuite concentré par ultrafiltration tangentielle sur membrane spirale Millipore ayant un seuil de coupure de 300 kDa.

15 Dans les expériences rapportées dans la présente invention, le facteur de concentration est dicté par le volume mort du système qui est de 100 ml. Des volumes de surnageant de 4 à 20 litres ont été concentrés avec ce système, permettant d'obtenir des volumes de concentrat de 100 ml à 200 ml sans difficultés, ce qui correspond à un facteur de concentration de 20 à 100 fois.

20 Le concentrat est ensuite filtré sur 0.22 μm puis purifié par centrifugation sur chlorure de césium comme décrit dans l'exemple 3, suivi d'une étape de dialyse.

4.2. Resultats

Pureté

25 Alors que le tube de virus intracellulaire (exemple 3) présente un aspect trouble avec un coagulum (lipides, protéines) venant parfois toucher la bande de virus, la préparation virale obtenue après la première étape de centrifugation sur chlorure de césium par le procédé de l'invention présente une bande de virus déjà bien isolée des contaminants du milieu qui persistent dans la phase supérieure. L'analyse en

chromatographie liquide haute performance sur colonne Resource Q (cf exemple 5) montre aussi ce gain en pureté du matériel de départ obtenu par ultrafiltration de surnageant infecté avec une diminution des contaminants acides nucléiques (ratio DO 260/280 supérieur ou égal à 1,8) et protéiques (ratio DO 260/280 inférieur à 1).

5 Stabilité du virus dans un surnageant à 37°C :

La stabilité du virus a été déterminée par titration par la méthode de plaque assay d'un surnageant de culture infectieux dont des aliquots ont été prélevés à différents temps d'incubation à 37°C post-infection. Les résultats sont présentés ci-dessous:

10 Virus Ad-TK :

. titre 10 jours post-infection = 3.5×10^8 pfu/ml

. titre 20 jours post-infection = 3.3×10^8 pfu/ml

Virus Ad-βGal

. titre 8 jours post-infection = 5.8×10^8 pfu/ml

15 . titre 9 jours post-infection = 3.6×10^8 pfu/ml

. titre 10 jours post-infection = 3.5×10^8 pfu/ml

. titre 13 jours post-infection = 4.1×10^8 pfu/ml

. titre 16 jours post-infection = 5.5×10^8 pfu/ml

20 Les résultats obtenus montrent que, jusqu'à au moins 20 jours post-infection, le titre du surnageant est stable dans la limite de précision du dosage. Par ailleurs, la Figure 1 montre que, dans le tampon d'élution, le virus est stable au moins 8 mois, à -80 C comme à -20 C.

Infectivité spécifique des préparations

- Ce parametre, correspondant au ratio du nombre de particules virales mesuré par HPLC sur le nombre de pfu, rend compte du pouvoir infectieux des preparations virales. Selon les recommandations de la FDA, il doit etre inferieur à 100. Ce parametre a ete mesure comme suit : Deux series de flacons de culture contenant des
- 5 cellules 293 ont été infectées en parallele au même moment avec le même prestock viral dans les mêmes conditions. Cette experience à été réalisée pour un adenovirus recombinant Ad-bgal, puis repetée pour un adenovirus Ad-TK. Pour chaque adenovirus, une serie de flacons est récoltée 48 heures post-infection et est considérée
- 10 comme une production de virus intracellulaire purifié sur gradient de cesium après congélation décongélation. L'autre serie est incubée 10 jours post-infection et le virus est récolté dans le surnageant. Les preparations purifiées obtenues sont titrées par plaque assay et la quantification du nombre de particules virales totales est determinée par la mesure de la concentration en proteine PVII par CLHP de phase inverse sur une
- 15 colonne C4 Vydac 4.6x50 mm après denaturation des échantillons en guanidine 6.4M. La quantité de protéines PVII est correlée au nombre de particules virales considerant 720 copies de PVII par virus (Horwitz, Virology, second edition (1990)). Cette methode est correlée avec les mesures de particules virales sur preparations purifiées par la methode densitometrique à 260 nm prenant pour coefficient d'extinction spécifique $1.0 \text{ unité d'absorbance} = 1.1 \cdot 10^{12} \text{ particules par ml}$
- 20 Les resultats obtenus montrent que, pour le virus Ad-βGal, ce ratio est de 16 pour le virus surnageant et de 45 pour le virus intracellulaire. Pour le virus Ad-TK, le ratio est de 78 dans le cas de la recolte de virus dans la méthode surnageant et de 80 pour le virus récolté par la méthode intracellulaire.

Analyse en microscopie electronique:

- 25 Cette methode permet de deceler la presence de particules vides ou sous unités virales libres copurifiées, ainsi que d'apprécier une contamination protéique des préparations virales purifiées ou la présence d'aggregats non dissociables de particules virales.

Protocole: 20 µl d'échantillon sont déposés sur une grille carbonée puis traités pour l'observation en coloration négative par l'acetate d'uranyl à 1,5%. Pour l'observation, on utilise un microscope électronique Jeol 1010 de 50kV à 100 kV.

Resultat: L'analyse effectuée sur un virus récolté dans le surnageant montre une préparation propre, sans contaminants, sans agrégats et sans particules virales vides. Il est de plus possible de distinguer les fibres du virus ainsi que sa structure géométrique régulière. Ces résultats confirment la grande qualité des particules virales obtenues selon l'invention.

Analyse du profil protéique en HPLC et SDS PAGE :

10 Analyse en SDS PAGE:

20µl d'échantillon est dilué dans le tampon de Laemmli (Nature 227 (1970) 680-685), réduit 5 min à 95°C, puis chargé sur des gels Novex 1 mm x 10 puits gradient 4-20%. Après migration, les gels sont colorés au bleu de coomassie et analysés sur Image Master VDS Pharmacia. L'analyse révèle un profil électrophorétique pour le virus récolté dans le surnageant en accord avec les données de la littérature (Lennart Philipson, 1984 H.S Ginsberg editors, Plenum press, 310-338).

Analyse en HPLC reverse phase:

La figure 2 montre la superposition de 3 chromatogrammes obtenus à partir de deux échantillons de virus récoltés en intracellulaire et un échantillon de virus purifié par la méthode surnageant. Les conditions expérimentales sont les suivantes : colonne Vydac ref 254 Tp 5405, RPC4 4.6x50 mm, Solvant A : H₂O + TFA 0.07%; Solvant B : CH₃CN+TFA 0.07%, gradient linéaire : T=0min %B=25; T=50min %B=50%; Débit =1ml/min, détecteur =215 nm. Les chromatogrammes montrent une parfaite identité entre les échantillons, sans différence dans les intensités relative de chaque pic. La nature de chaque pic a été déterminée par séquençage et met en évidence que les protéines présentes sont toutes d'origine virale (Voir Tableau ci-dessous).

PIC (Min)	IDENTIFICATION
19-20	Precurseur PVII
21-22	Precurseur PVII; Precurseur PX 1 a 12
27-28	Precurseur PVI; Precurseur PX
32-33	Precurseur PX
34	
35-36	PVII mature
37	PVII mature; PVIII precurseur
39-41	PVI mature
45	pX
46	pIX

Analyse in vitro de l'efficacité de transduction et de la cytotoxicité

L'analyse de la cytotoxicité est effectuée en infectant des cellules HCT116 en plaques 24 puits pour des MOI croissantes et en déterminant le pourcentage de cellules vivantes par rapport à un témoin non infecté, 2 et 5 jours post-infection, à l'aide de la technique de coloration au cristal violet.

Les résultats sont présentes dans le tableau ci-dessous :

Adenovirus	MOI=3.0	MOI=10.0	MOI=30.0	MOI=100.0
Sumageant,J2	91%	96%	87%	89%
Sumageant,J5	97%	90%	10%	<5%

Analyse de l'efficacité de transduction

Pour un adenovirus AD- β Gal, l'efficacité de transduction d'une préparation est déterminée en infectant des cellules W162, non permissives à la réplication, cultivées en plaques 24 puits, avec des concentrations croissantes de particules virales. Pour une même quantité de particules virales déposées, on dénombre, 48 heures post-infection, les cellules exprimant l'activité betagalactosidase après incubation avec l'X-gal comme substrat. Chaque cellule bleue est dénombrée comme une unité de transduction

(TDU), le résultat est multiplié par la dilution de l'échantillon afin d'obtenir la concentration en unité de transductions de l'échantillon. L'efficacité de transduction est ensuite exprimée en faisant le rapport de la concentration en particules virales sur la concentration en TDU. Les résultats obtenus montrent que les virus purifiés
5 présentent une bonne efficacité de transduction in vitro.

Analyse de l'expression intracérébrale In vivo

Dans le but d'évaluer l'efficacité des adenovirus selon l'invention pour le transfert et l'expression de gènes in vivo, les adenovirus ont été injectés par voie stéréotaxique dans le striatum de souris immunocompétentes OF1. Pour cela, des
10 volumes de 1 µl à 10⁷ pfu de virus ont été injectés aux repères stéréotaxiques suivants (pour la barre d'incisives à 0mm) : Antéro-postérieur: +0.5; Médio-latéral :2; Profondeur: -3.5.

Les cerveaux ont été analysés 7 jours après l'injection. Les résultats obtenus montrent que l'efficacité de transduction est grande : milliers de cellules transduites,
15 expression très intense dans le noyau et diffusion fréquente et intense dans le cytoplasme.

4.3. Cinétique de libération du virus

Cet exemple décrit une étude de la cinétique de libération des adenovirus dans le surnageant de culture des cellules d'encapsulation.

20 Cette étude a été réalisée par PCR semi-quantitative au moyen d'oligonucléotides complémentaires de régions du génome de l'adenovirus. A cet effet, l'ADN viral linéarisé (1-10 ng) a été incubé en présence de dXTP (2 µl, 10mM), d'un couple d'oligonucléotides spécifiques et de Taq Polymerase (Cetus) dans un tampon 10XPCR, et soumis à 30 cycles d'amplification dans les conditions suivantes :
25 2 min à 91°C, 30 cycles (1 min 91°C, 2 min à température d'annealing, 3 min à 72°C), 5 min 72°C, puis 4°C. Des expériences de PCR ont été réalisées avec les couples d'oligonucléotides de séquence :

- Couple 1 :

TAATTACCTGGGCGGCGAGCACGAT (6368) - SEQ ID n° 1

ACCTTGATGGGACCGCTGGGAACA (6369) - SEQ ID n° 2

-Couple 2 :

5 TTTTGTATGCGTTTCTTACCTCTGG (6362) - SEQ ID n° 3

CAGACAGCGATGCGGAAGAGAGTGA (6363) - SEQ ID n° 4

- Couple 3 :

TGTTCCCAGCGGTCCCATCCAAGGT (6364) - SEQ ID n° 5

AAGGACAAGCAGCCGAAGTAGAAGA (6365) - SEQ ID n° 6

10 - Couple 4 :

GGATGATATGGTTGGACGCTGGAAG (6366) - SEQ ID n° 7

AGGGCGGATGCGACGACACTGACTT (6367) - SEQ ID n° 8

La quantite d'adenovirus libere dans le surnageant a ete determinee sur un surnageant de cellules 293 infectees par l'Ad-βGal, a differents temps post-infection.

15 Les resultats obtenus sont presentes dans la figure 3. Ils montrent que la liberation cellulaire debute a partir du 5 ou 6eme jour post infection.

Il est entendu que toute autre technique de determination de virus peut etre utilisee dans le meme but, sur toute autre lignee d'encapsidation, et pour tout type d'adenovirus.

20 **Exemple 5 : Purification du virus par ultrafiltration et echange d'ions**

Cet exemple illustre comment l'adénovirus contenu dans le concentrat peut être purifié directement et en une seule étape chromatographique d'échange d'ions, avec des rendements très élevés.

5.1. Protocole

5 Dans cette expérience, le matériel de départ est donc constitué du concentrat (ou rétentat d'ultrafiltration) décrit dans l'exemple 4. Ce rétentat a une teneur en protéines totales comprise entre 5 et 50 mg/ml, et plus préférentiellement entre 10 et 30 mg/ml, dans du tampon PBS (10 mM phosphate, pH 7,2 contenant 150 mM NaCl).

10 Le surnageant d'ultrafiltration obtenu à partir d'une préparation de virus est injecté sur une colonne contenant du Source Q 15 (Pharmacia) équilibrée dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 8,0 contenant 250 mM NaCl, 1,0 mM MgCl₂, et 10 % glycérol (tampon A). Après rinçage avec 10 volumes de colonne de tampon A, les espèces adsorbées sont éluées avec un gradient linéaire de NaCl (250 mM à 1 M) sur
15 25 volumes de colonne à un débit linéaire de 60 à 300 cm/h, plus préférentiellement 12 cm/h. Le profil d'élution typique obtenu à 260 nm est présenté sur la figure 4. La fraction contenant les particules virales est collectée. Elle correspond à un pic fin, symétrique, dont le temps de rétention coïncide avec le temps de rétention obtenu avec une préparation de particules virales purifiées par ultracentrifugation. Il est
20 possible d'injecter dans les conditions décrites ci-dessus, au minimum 30 mg de protéines totales par ml de résine Source Q 15 tout en conservant une résolution excellente du pic de particules virales.

25 Dans une expérience représentative effectuée à partir d'une préparation d'un adénovirus β -gal (Exemple 2), 12,6 mg de protéines totales ont été injectées sur une colonne Resource Q (1 ml), soit 5×10^{10} PFU et $1,6 \times 10^{10}$ TDU. Le pic de particules virales collecté après chromatographie (3,2 ml; Fig. 5) contenait 173 μ g de protéines et $3,2 \times 10^{10}$ PFU et $2,3 \times 10^{10}$ TDU. Les particules virales ont donc été purifiées 70

fois (en terme de quantité de protéines) et le rendement de la purification est de 64% en PFU et de 142 % en TDU (Voir Tableau ci-dessous).

Etapes	Concentration echantillon	Volumes deposes	Volumes recuperes	Rendements	Facteur de Purification
SURNAGEANT		5000 ml	5000 ml	100 %	—
ULTRA- FILTRATION 300 kd	Proteines: 6.3 mg/ml PFU: 2.5×10^{10} /ml TDU: 8.1×10^9 /ml Particle 3.8×10^{11} /ml Part/pfu ratio: 16.0 Part/tdu ratio: 47.0	5000 ml	200 ml	100 %	5
PURIFICATION ECHANGE IONS (une etape)	PFU: 1.0×10^{10} /ml TDU: 7.2×10^9 /ml Particle: 2.0×10^{11} /ml Part/pfu ratio=20 Part/tdu ratio=27	2.0 ml de concentrat	3.0 ml elution	Proteines=85% PFU=64% TDU=140% Particles=84% HPLC Purete=98.4%	70

GRADIENT CsCl	PFU:1.0x10 ¹¹ /ml TDU:7.5x 10 ¹⁰ /ml Particle:2.2x10 ¹² /ml Part/pfu ratio=22 par/tdu ratio=29	28.3 ml de concentrat	QSP 4.1 ml	PFU=66% TDU=130% Particles=84% HPLC purete=98.4%	70
------------------	---	--------------------------	---------------	--	----

5.2. Pureté

Après cette étape de purification, la fraction collectée présente une pureté \geq 98% en particules virales (détection UV à 260 nm), lorsqu'elle est analysée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur une colonne de Resouce Q (1 ml) dans un système chromatographique suivant: 10 μ l de la fraction purifiée par chromatographie comme décrit à l'exemple 5.1 sont injectés sur une colonne Resource Q15 (1ml de gel; Pharmacia) équilibrée dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 8,0 (tampon B). Après rinçage avec 5 ml de tampon B, les espèces adsorbées sont élues avec un gradient linéaire de 30 ml de NaCl (0 à 1 M) dans le tampon B à un débit de 1 ml/min. Les espèces éluées sont détectées à 260 nm. Cette analyse par CLHP (Figure 5) montre de plus que l'albumine sérique bovine résiduelle présente dans le rétentat d'ultrafiltration est totalement éliminée au cours de la chromatographie préparative. Sa teneur dans la fraction purifiée est estimée être $< 0,1$ %. L'analyse en Western blot avec un anticorps polyclonal anti-BSA (avec révélation ECL; Amersham) indique que la teneur en BSA dans la préparation chromatographique est inférieure à 100 ng par mg de virus.

L'analyse en électrophorèse de la fraction adénovirale purifiée par chromatographie est effectuée en gel de polyacrylamide (4-20 %) en conditions dénaturantes (SDS). Les bandes de protéines sont ensuite révélées au nitrate d'argent. Cette analyse montre que la préparation adénovirale obtenue par chromatographie a un niveau de pureté au moins égal à celui de la préparation obtenue classiquement par

ultracentrifugation puisqu'elle ne présente pas de bande de protéines supplémentaire qui indiquerait une contamination de la préparation par des protéines non adénovirales.

La préparation adénovirale obtenue par chromatographie présente un ratio
5 d'absorbance $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$ égal à $1,30 \pm 0,05$. Cette valeur, qui est identique à celle obtenue pour les meilleures préparations obtenues par ultracentrifugation, indique que la préparation est dépourvue de protéines contaminantes ou d'acides nucléiques contaminants.

L'analyse en microscopie électronique effectuée dans les conditions décrites
10 dans l'exemple 4.2 sur un virus Ad- β gal purifié par chromatographie montre une préparation propre, sans contaminants, sans aggrégats et sans particules virales vides (figure 11). De plus, l'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium de cette préparation révèle une seule bande de densité 1.30, ce qui confirme l'absence de contamination des préparations chromatographiques par d'éventuelles particules
15 vides ou des fragments de capsides. Lors de la purification, le pic chromatographique du virus est suivi d'un épaulement (ou pic secondaire) dans sa partie arrière, qui n'est pas collecté avec le pic principal. L'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium de cette fraction révèle une bande de densité 1.27, et l'analyse de la composition de cette fraction montre qu'elle ne contient pas d'acides nucléiques.
20 L'analyse en microscopie électronique montre que cette fraction contient des particules de forme irrégulière, présentant des perforations à la surface (figure 12). Il s'agit donc de particules vides (dépourvues d'ADN) et incomplètes. Ceci démontre donc que la purification de l'adénovirus par chromatographie élimine les particules vides présentes en faible quantité dans les préparations avant purification.

25 5.3. Purification d'adénovirus comportant un gène thérapeutique tel que les gènes codant pour les protéines ApoA1 ou thymidine kinase.

Cet exemple illustre comment des adénovirus comportant dans leurs génomes des séquences d'acides nucléiques hétérologues codant pour des protéines

thérapeutiques peuvent être purifiés directement et en une seule étape chromatographique d'échange d'ions. Il montre aussi que le comportement chromatographique de l'adénovirus est indépendant des séquences d'acides nucléiques hétérologues qu'il porte, ce qui permet de mettre en oeuvre le même procédé de purification pour différents adénovirus porteurs de séquences d'acides nucléiques hétérologues diverses.

Dans une expérience typique de purification, un adénovirus comportant dans son génome une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour la protéine ApoA1 (Exemple 2, WO94/25073) est purifié en chromatographiant, dans le système décrit à l'exemple 5.1, 18 ml (72 mg de protéines; $1,08 \times 10^{13}$ particules) de surnageant concentré d'une culture cellulaire récoltée 10 jours post-infection (Figure 6A). Le pic de particules virales collecté après chromatographie (14 ml; 1,4 mg de protéines) contenait $9,98 \times 10^{12}$ particules, ce qui indique un rendement en particules de 92% et un facteur de purification de 51. Après cette étape de purification, la fraction collecté présentait (Figure 6B) une pureté supérieure à 98% en particules virales lors de l'analyse chromatographique dans les conditions décrites en 5.2. L'analyse par électrophorèse de la fraction adénovirale purifiée par chromatographie effectuée dans les conditions décrites à l'exemple 5.2. a montré que cette préparation avait un niveau de pureté au moins égal à celui de la préparation obtenue classiquement par ultracentrifugation, et qu'elle est dépourvue de protéines contaminantes ou d'acides nucléiques contaminants.

Dans une autre expérience typique de purification, un adénovirus comportant dans son génome une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour la protéine thymidine kinase de herpès simplex de type 1 (Exemple 2, WO95/14102) est purifié en chromatographiant dans le système décrit à l'exemple 5.1. 36 ml (180 mg de protéines; $4,69 \times 10^{13}$ particules) de surnageant concentré d'une culture cellulaire (Figure 7A). Le pic de particules virales collecté après chromatographie (20 ml; 5,6 mg de protéines) contenait $4,28 \times 10^{13}$ particules, ce qui indique un rendement en particules de 91% et un facteur de purification de 32. Après cette étape de

purification, la fraction collectée présentait (Figures 7B-D) une pureté supérieure à 99% en particules virales lors de l'analyse chromatographique dans les conditions décrites à l'exemple 5.2. et un ratio d'absorbance de 1,29. L'analyse en électrophorèse de la fraction adénovirale purifiée par chromatographie effectuée dans les conditions
5 décrites à l'exemple 5.2. a montré que cette préparation avait un niveau de pureté au moins égal à celui de la préparation obtenue classiquement par ultracentrifugation, et qu'elle est dépourvue de protéines contaminantes ou d'acides nucléiques contaminants.

5.4. Purification d'adénovirus intracellulaire par échange d'anion fort.

10 Cet exemple illustre comment un adénovirus comportant dans son génome une séquence d'acide nucléique hétérologue peut être purifié directement en une seule étape chromatographique d'échange d'ions à partir d'un lysat de cellules d'encapsidation productrices dudit virus.

Dans une expérience typique de purification, un adénovirus comportant dans
15 son génome une séquence d'acide nucléiques hétérologue codant pour la protéine β -gal est purifié en chromatographiant dans le système décrit à l'exemple 5.1 (colonne FineLine Pilot 35, Pharmacia, 100 ml de résine Source 15Q), 450 ml (soit 2.5×10^{14} particules) de lysat concentré d'une culture cellulaire récoltée 3 jours post-infection par lyse chimique (1% Tween-20). Le pic de particules virales collecté après
20 chromatographie (110 ml) contenait 2.15×10^{14} particules, ce qui indique un rendement en particules de 86%. Après cette étape de purification, la fraction collectée présentait une pureté supérieure à 98% en particules virales lors de l'analyse chromatographique dans les conditions décrites en 5.2. L'analyse par électrophorèse de la fraction adénovirale purifiée par chromatographie effectuée dans les conditions
25 décrites à l'exemple 5.2 a montré que cette préparation avait un niveau de pureté au moins égal à celui d'une préparation obtenue classiquement par ultracentrifugation, et qu'elle est dépourvue de protéines contaminantes ou d'acides nucléiques contaminants.

5.5. Purification du virus par ultrafiltration et chromatographie d'échange d'ions sur différentes colonnes.

Cet exemple illustre comment l'adénovirus contenu dans le concentrat peut être purifié directement et en une seule étape chromatographique d'échange d'ions en utilisant un gel différent du support Source 15 Q, tout en fonctionnant sur le même principe de séparation, l'échange d'anions par interaction avec les groupements aminés quaternaires de la matrice.

Dans une expérience typique de purification de l'adénovirus, différents adénovirus recombinants (codant pour la β Gal, l'apolipoprotéine AI et la TK) ont été purifiés par chromatographie sur une colonne de gel Source Q30 en suivant le protocole décrit à l'exemple 5.1. Les résultats obtenus montrent que le gel Source Q30 permet d'obtenir des préparations virales d'une pureté de l'ordre de 85%, avec un rendement compris entre 70 et 100 %. En outre, les résultats obtenus montrent que Q30 possède, pour la purification d'adénovirus, une efficacité (exprimée par le nombre de plateaux théoriques) de 1000 et une (quantité maximum de virus qui peut être chromatographiée sans que les pics ne s'altèrent) de $0,5$ à 1×10^{12} pv par ml. Ces résultats montrent que le gel Source Q30 peut donc convenir à la purification d'adénovirus recombinants, même si ses propriétés demeurent inférieures à celles du Source Q15 (pureté de l'ordre de 99%, efficacité de l'ordre de 8000 et capacité de l'ordre de $2,5$ à 5×10^{12} pv par ml).

Dans une autre expérience typique de purification de l'adénovirus, un adénovirus β -Gal est purifié par chromatographie sur une colonne de MonoQ HR 5/5 en suivant le protocole décrit à l'exemple 5.1. L'image chromatographique correspondant au rétentat d'ultrafiltration et à la préparation virale purifiée ainsi obtenue est illustrée sur la Figure 8.

Dans une autre expérience typique de purification de l'adénovirus, un adénovirus β -Gal est purifié par chromatographie sur une colonne Poros HQ/M en suivant le protocole décrit à l'exemple 5.1. L'image chromatographique correspondant

au rétentat d'ultrafiltration et à la préparation virale purifiée ainsi obtenue est illustrée sur la Figure 9.

Exemple 6 : Purification du virus par ultrafiltration et perméation de gel

Cet exemple illustre comment l'adénovirus contenu dans le concentrat
5 (rétentat d'ultrafiltration) peut être purifié directement par chromatographie de perméation de gel, avec des rendements très élevés.

6.1. Protocole

200 µl du rétentat d'ultrafiltration obtenu dans l'exemple 4 (soit 1,3 mg de protéines) sont injectés sur une colonne HR 10/30 (Pharmacia) remplie de Sephacryl
10 S-1000SF (Pharmacia) équilibrée par exemple dans du tampon PBS, pH 7,2 contenant 150 mM NaCl (tampon C). Les espèces sont fractionnées et éluées avec le tampon C à un débit de 0,5 ml/min et détectées en sortie de la colonne en UV à 260 nm. Alternativement, on peut utiliser dans les mêmes conditions de mise en oeuvre, une colonne remplie de Sephacryl S-2000, qui permet une résolution meilleure que la
15 colonne Sephacryl S-1000HR pour des particules de 100 nm à 1000 nm.

La résolution des deux systèmes chromatographiques de perméation de gel décrit ci-dessus peut être avantageusement améliorée en chromatographiant le surnageant d'ultrafiltration (200 µl) sur un système de 2 colonnes HR 10/30 (Pharmacia) couplées en série (colonne de Sephacryl S-1000HR ou S-2000 suivie
20 d'une colonne de Superdex 200 HR) équilibrées dans le tampon C. Les espèces sont éluées avec le tampon C à un débit de 0,5 ml/min et détectées en UV à 260 nm. Dans ce système, le pic de particules virales est très nettement mieux séparé des espèces de plus faible poids moléculaire que dans le système comportant une colonne Sephacryl S-1000 HR ou Sephacryl S-2000 seule.

25 Dans une expérience représentative, un rétentat d'ultrafiltration (200 µl, 1.3mg de protéines) a été chromatographié sur un système de 2 colonnes Sephacryl S-1000HR-Superdex 200 HR 10/30 (Figure 10). Le pic chromatographique contenant les particules virales a été collecté. Son temps de rétention coïncide avec le temps de

- 5 rétention obtenu avec une préparation de particules virales purifiées par ultracentrifugation. Le pic de particules virales collecté après chromatographie (7 ml) contenait 28 µg de protéines et $3.5 \cdot 10^9$ PFU. Son analyse par chromatographie analytique d'échange d'ions dans les conditions décrites à l'exemple 5.2. montre la présence d'un pic contaminant plus fortement retenu sur la colonne d'analyse, dont la surface représente environ 25% de la surface du pic viral. Son ratio d'absorbance 260nm/280nm qui a une valeur de 1,86 indique que ce pic contaminant correspond à des acides nucléiques. Les particules virales ont donc été purifiées environ 50 fois (en terme de quantité de protéines) et le rendement de la purification est de 85% en PFU.
- 10 Alternativement, il est possible de chromatographier les préparations de particules virales (ultrafiltrats ou fractions en sortie de chromatographie d'échange d'anions) sur une colonne TSK G6000 PW (7,5 x 300 mm; TosoHaas) équilibrée dans le tampon C. Les espèces sont éluées avec le tampon C à un débit de 0,5 ml/min et détectées en UV à 260 nm. De même il peut être avantageux d'augmenter la
- 15 résolution du système chromatographique, en particulier d'augmenter la séparation du pic de particules virales des espèces de plus faible poids moléculaire, en chromatographiant le surnageant d'ultrafiltration (50 à 200 µl) sur un système de 2 colonnes couplées en série [colonne de TSK G6000 PW (7,5 x 300 mm) suivie d'une colonne de Superdex 200 HR] équilibrées dans le tampon C. Les espèces sont éluées
- 20 avec le tampon C à un débit de 0,5 ml/min et détectées en UV à 260 nm.

Exemple 7 : Purification du virus par Ultrafiltration, Echange d'ions et Permeation de Gel

- 25 La fraction de particules virales issue de la chromatographie d'échange d'anions (exemple 5) peut être avantageusement chromatographiée dans l'un des systèmes chromatographiques par perméation de gel décrit ci-dessus, par exemple dans le but d'améliorer encore le niveau de pureté des particules virales, mais aussi principalement dans le but de conditionner les particules virales dans un milieu compatible ou adapté aux utilisations ultérieures de la préparation virale (injection,...).

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Rhone Poulenc Rorer SA
- (B) RUE: 20, avenue Raymond Aron
- (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 920165

10

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PROCEDE DE PRODUCTION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS.

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

20

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TAATTACCTG GCGGCGAGC ACGAT

25

40 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

45

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ACCTTGGATG GGACCGCTGG GAACA

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

55

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

60

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TTTTTGATGC GTTCTTACC TCTGG

25

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

10

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CAGACAGCGA TCGGAAGAG AGTGA

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TGTTCCCAGC GGTCCCATCC AAGGT

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

35

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

40

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

AAGGACAAGC AGCCGAAGTA GAAGA

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

50

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGATGATATG GTTGGACGCT GGAAG

25

5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

10 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AGGGCGGATG CGACGACACT GACTT

25

REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'adénovirus recombinants caractérisé en ce que l'ADN viral est introduit dans une culture de cellules d'encapsidation et les virus produits sont récoltes apres liberation dans le surnageant.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la recolte est realisee lorsque 50% au moins des virus ont ete liberes dans le surnageant.
3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la recolte est realisee lorsque 70% au moins des virus ont ete liberes dans le surnageant.
4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la recolte est realisee
10 lorsque 90% au moins des virus ont ete liberes dans le surnageant.
5. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les virus sont recoltes par ultrafiltration.
6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'ultrafiltration est une ultrafiltration tangentielle.
- 15 7. Procédé selon la revendication 5 ou 6 caractérisé en ce que l'ultrafiltration est realisee sur une membrane ayant un seuil de coupure inferieur a 1000 kDa.
8. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les virus sont recoltes par chromatographie d'echange d'anions.
9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que la chromatographie
20 d'echange d'anions est une chromatographie d'echange d'anions forts.
10. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que la chromatographie d'echange d'anions forts est realisee sur un support choisi parmi les résines Source Q, Mono Q, Q Sepharose, Poros HQ et Poros QE, les résines de type Fractogel TMAE et Toyopearl Super Q.

11. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les virus sont recoltés par chromatographie de perméation de gel.

12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que la chromatographie de perméation de gel est réalisée sur un support choisi parmi les gels Sephacryl S-500
5 HR, Sephacryl S-1000 SF, Sephacryl S-1000 HR, Sephacryl S-2000, Superdex 200 HR, Sepharose 2B, 4B ou 6B et TSK G6000 PW.

13. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les virus sont recoltés par ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'échange d'anions.

14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que les virus sont
10 recoltés par ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'échange d'anions puis d'une chromatographie de perméation de gel.

15. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la cellule d'encapsulation est une cellule trans-complémentant la fonction E1 de l'adenovirus.

16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que la cellule
15 d'encapsulation est une cellule trans-complémentant les fonctions E1 et E4 de l'adenovirus.

17. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que la cellule d'encapsulation est une cellule trans-complémentant les fonctions E1 et E2a de
20 l'adenovirus.

18. Procédé selon l'une des revendications 15 à 17 caractérisé en ce que la cellule est une cellule embryonnaire de rein humaine, un retinoblaste humain ou une cellule d'un carcinome humain.

19. Procédé de purification d'adénovirus recombinants à partir d'un milieu
25 biologique caractérisé en ce qu'il comprend une étape de purification par chromatographie d'échange d'anions fort.

20. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que le milieu biologique est un surnageant de cellules d'encapsulation productrices dudit virus.
21. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que le milieu biologique est un lysat de cellules d'encapsulation productrices dudit virus.
- 5 22. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que le milieu biologique est une solution prepurifiée dudit virus.
23. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que la chromatographie est effectuée sur un support fonctionnalisé avec une amine quaternaire.
- 10 24. Procédé selon la revendication 23 caractérisé en ce que le support est choisi parmi l'agarose, le dextran, l'acrylamide, la silice, le poly[styrene-divinylbenzene], le copolymère éthylène glycol-méthacrylate, seul ou en mélange.
25. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que la chromatographie est effectuée sur une résine Source Q, Mono Q, Q Sepharose, Poros HQ, Poros QE, Fractogel TMAE, ou Toyopearl Super Q.
- 15 26. Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que la chromatographie est effectuée sur une résine Source Q, de préférence Source Q15.
27. Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce qu'il comprend une étape préalable d'ultrafiltration.
- 20 28. Procédé selon la revendication 27 caractérisé en ce que l'ultrafiltration est une ultrafiltration tangentielle sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 300 et 500 kDa.
29. Préparation virale purifiée obtenue selon le procédé de la revendication 1 ou 19.
- 25 30. Composition pharmaceutique comprenant une préparation virale selon la revendication 29 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

31. Utilisation de iodixanol, 5,5'-[(2-hydroxy-1-3propanediyl)-bis (acetylamino)]bis[N,N'-bis(2,3dihydroxypropyl-2,4,6-triido-1,3-benzenecarboxa mi de] pour la purification d'adenovirus.

32. Procédé de purification d'adenovirus à partir d'un milieu biologique
5 comprenant une première étape d'ultracentrifugation, une deuxième étape de dilution ou dialyse, et une troisième étape de chromatographie d'échange d'anions.

1/17

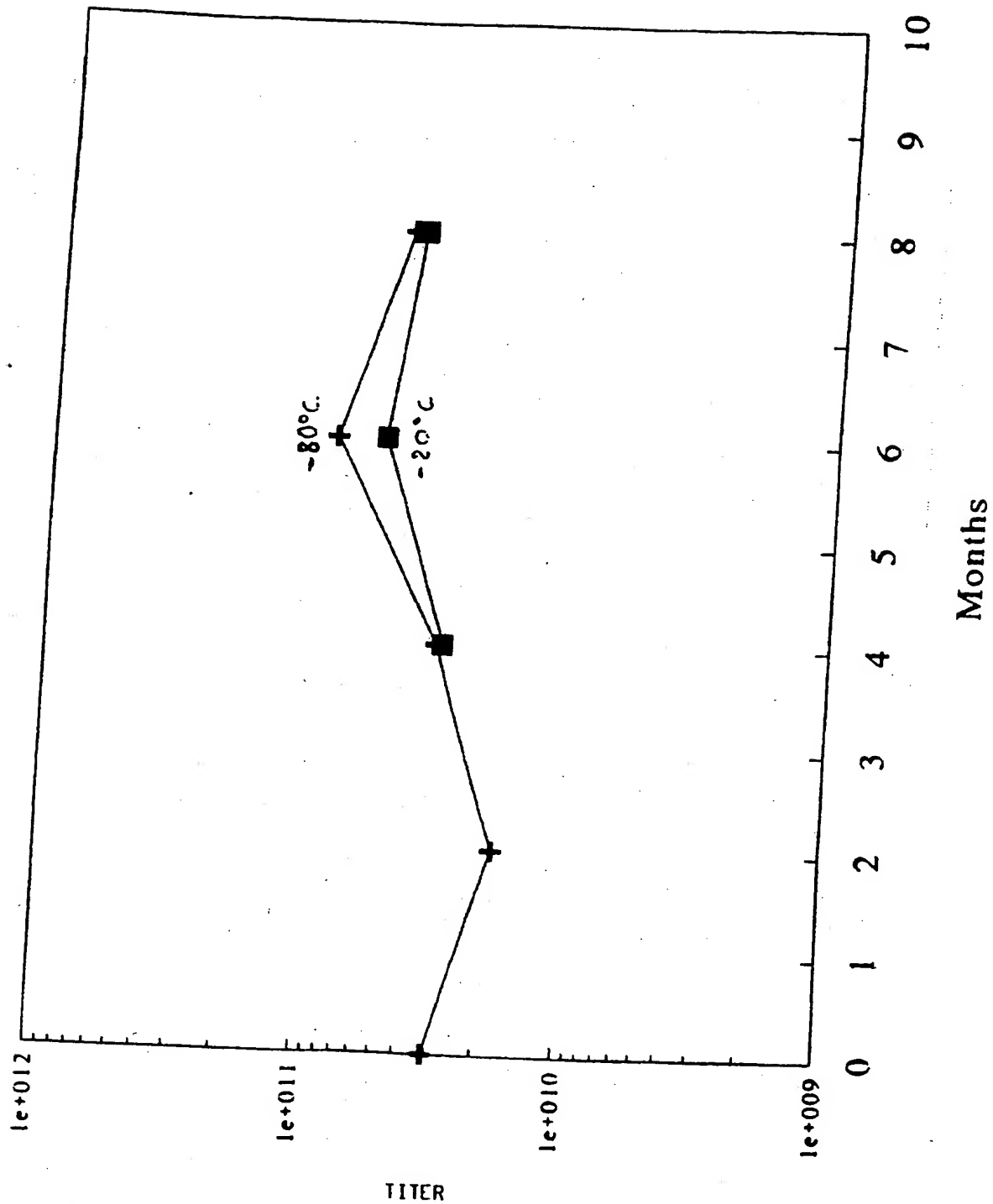


FIGURE 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

2/17

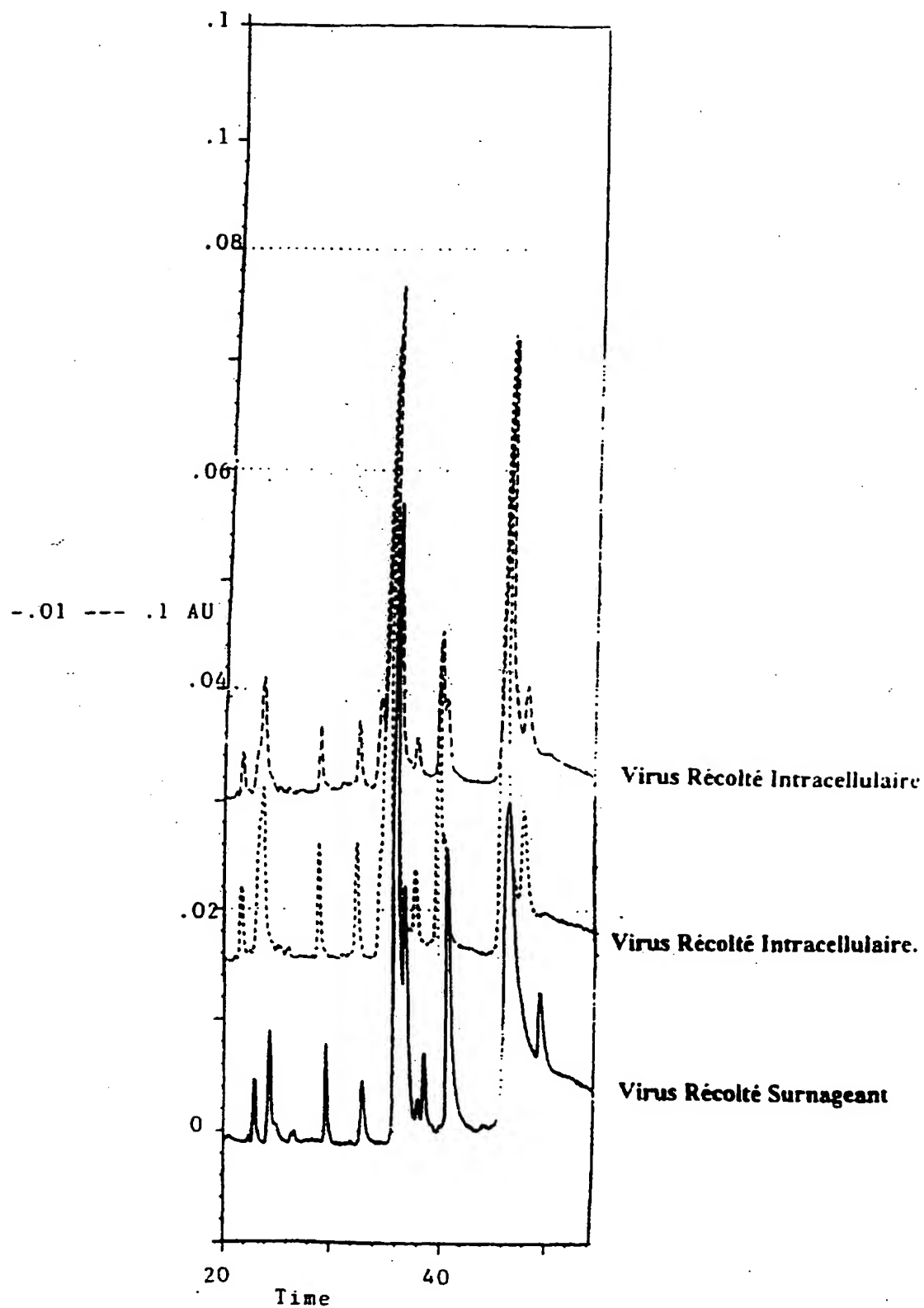


FIGURE 1

3/17

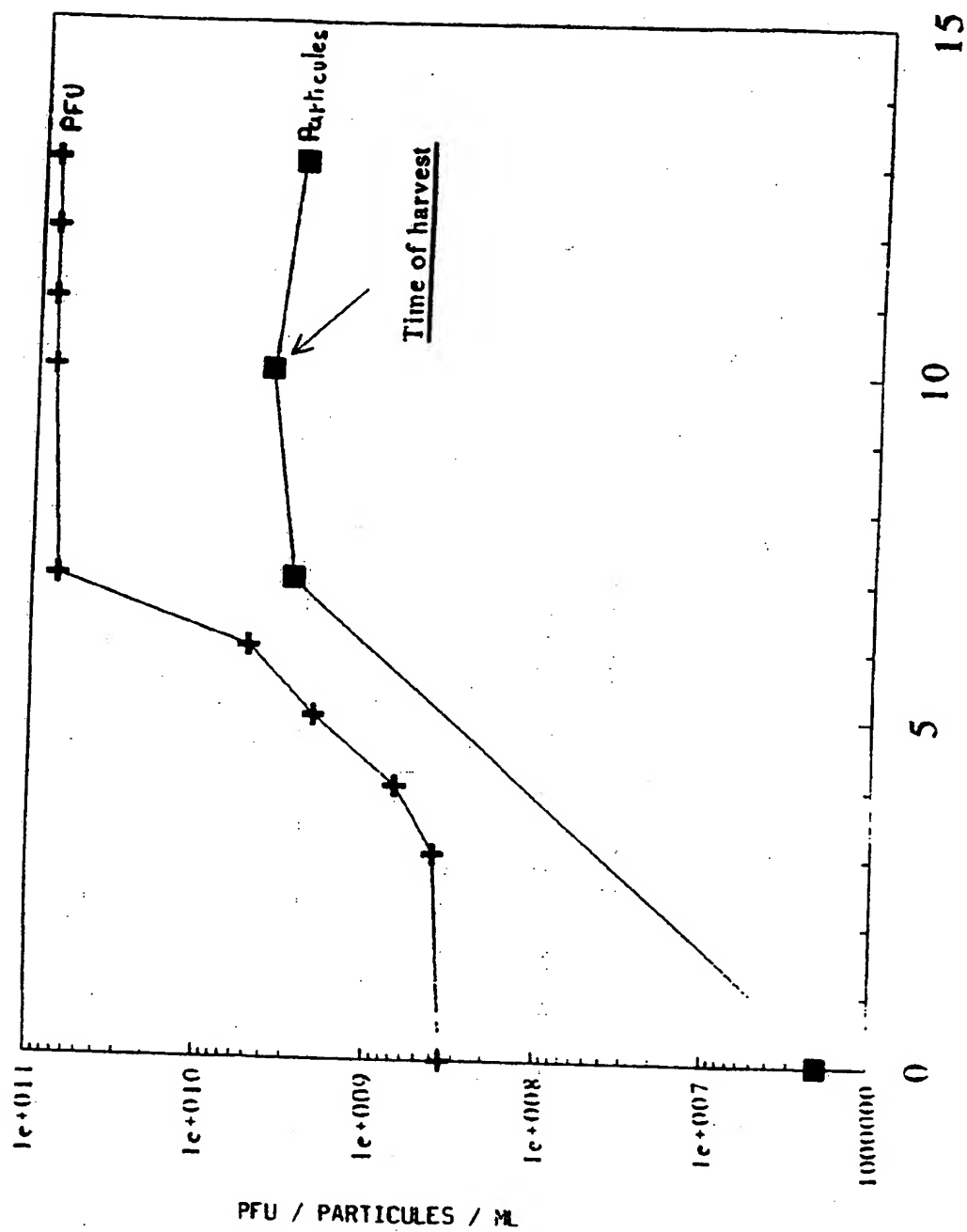


FIGURE 3

4/17

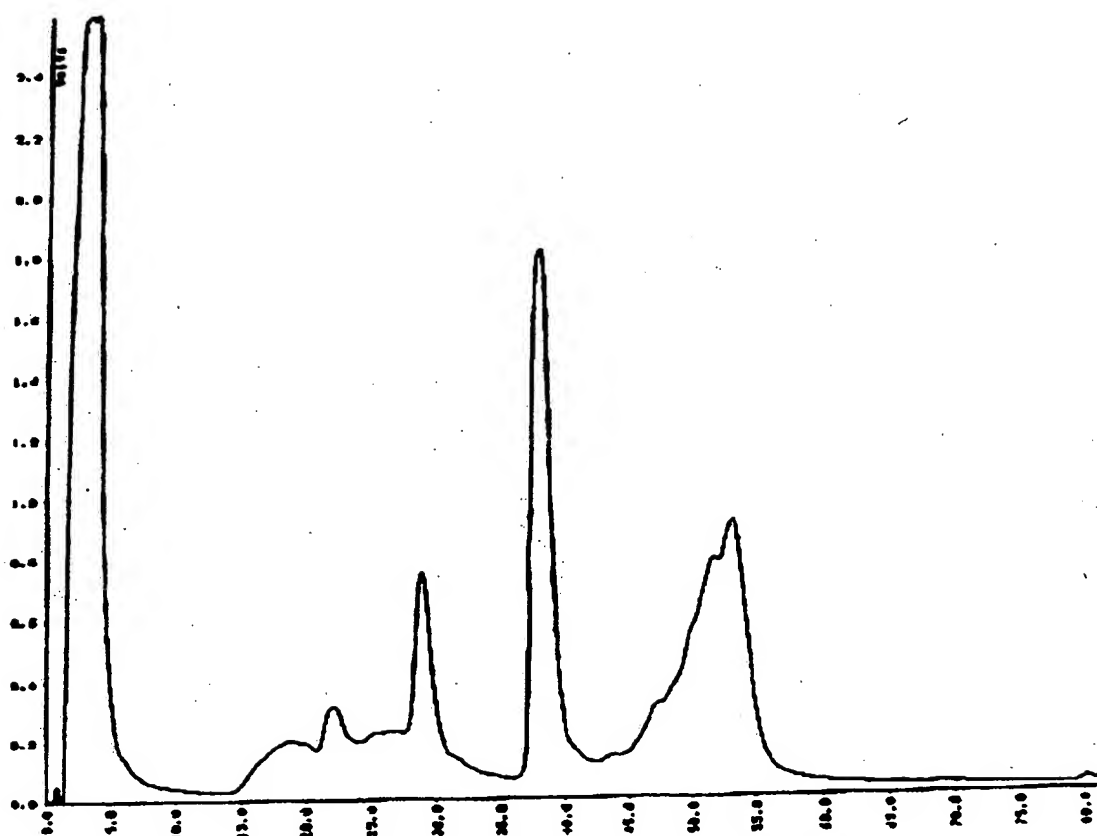


FIGURE 4

5/17

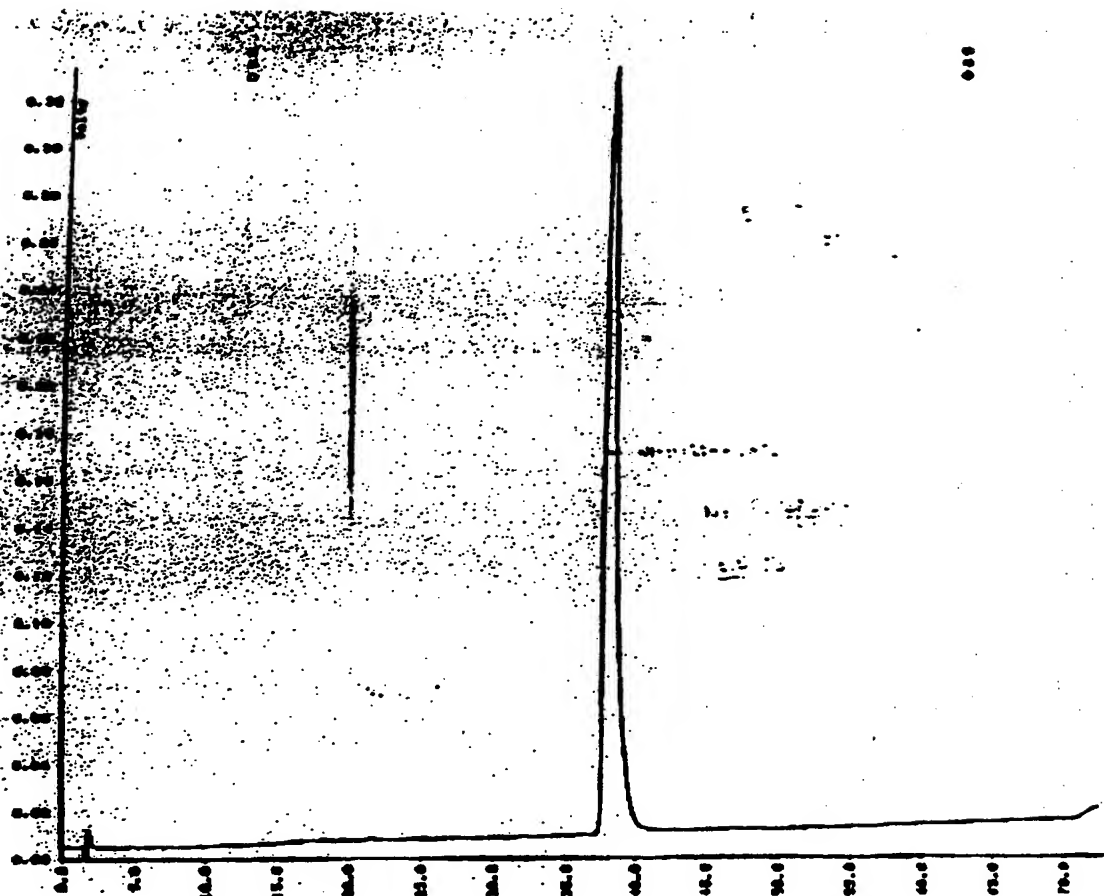


FIGURE 5

6/17

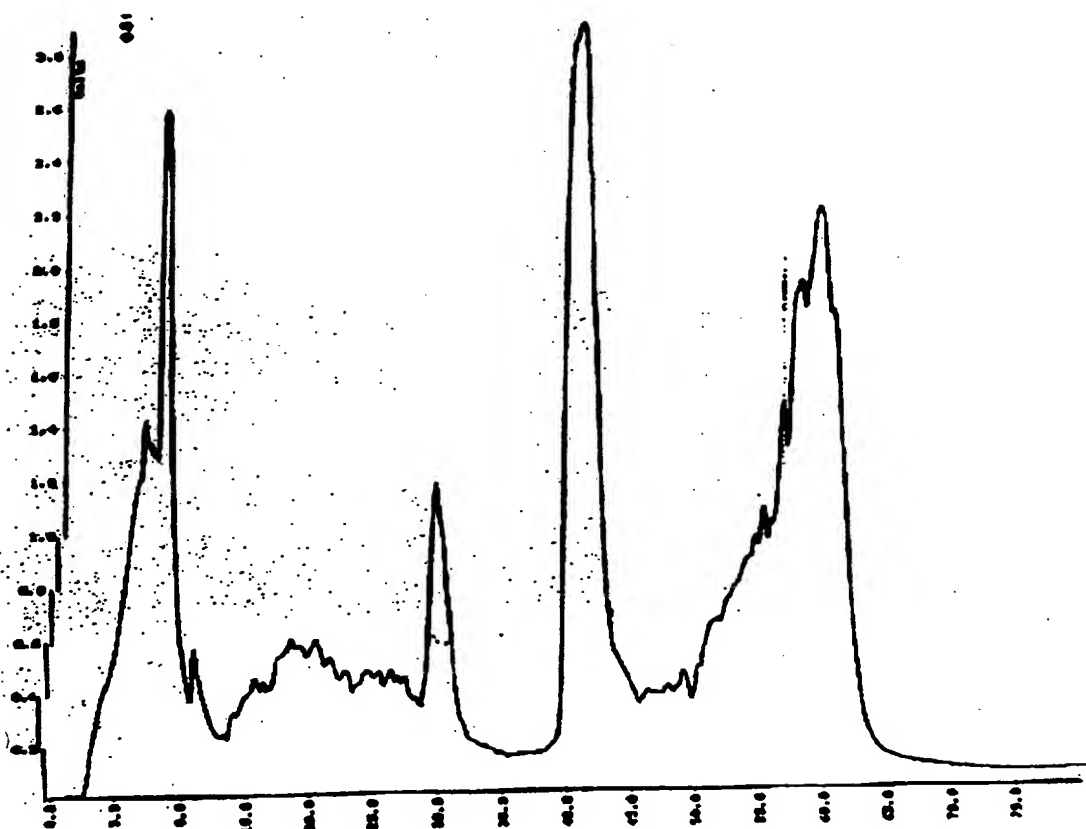


FIGURE 6A

7/17

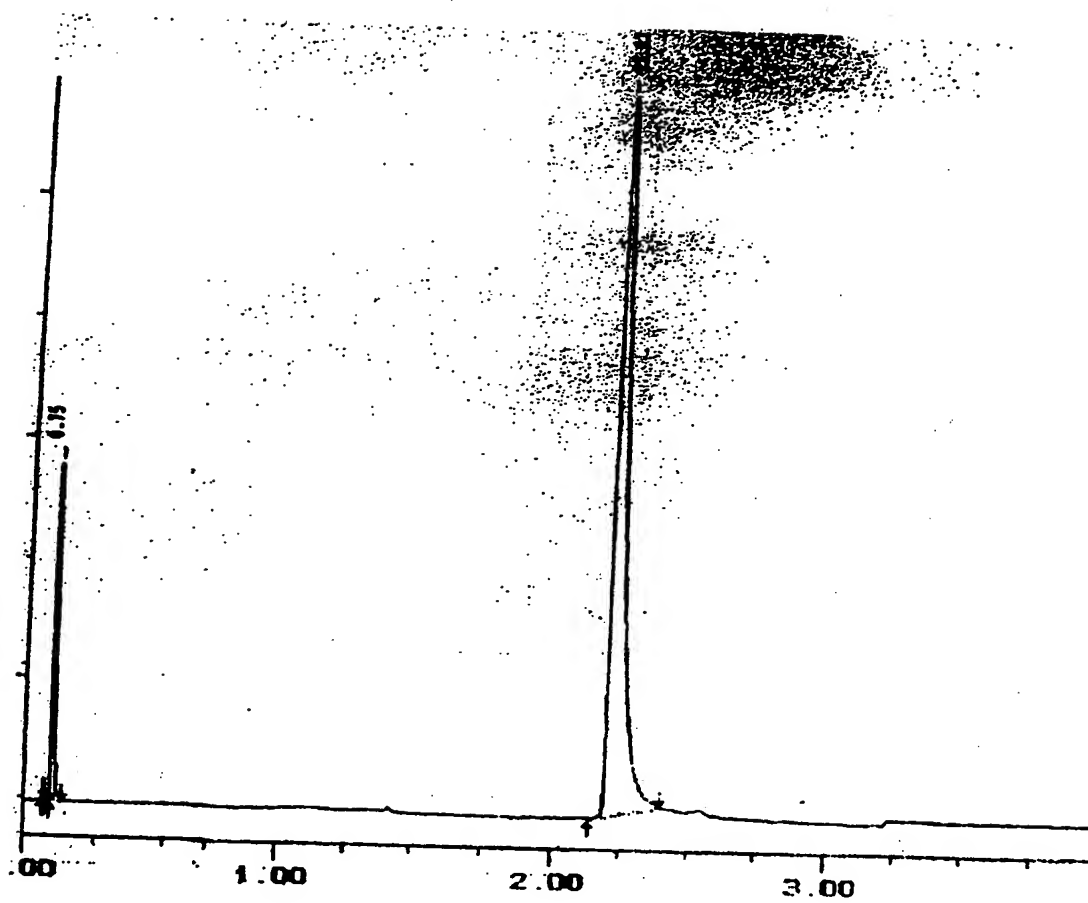


FIGURE 6B

8/17

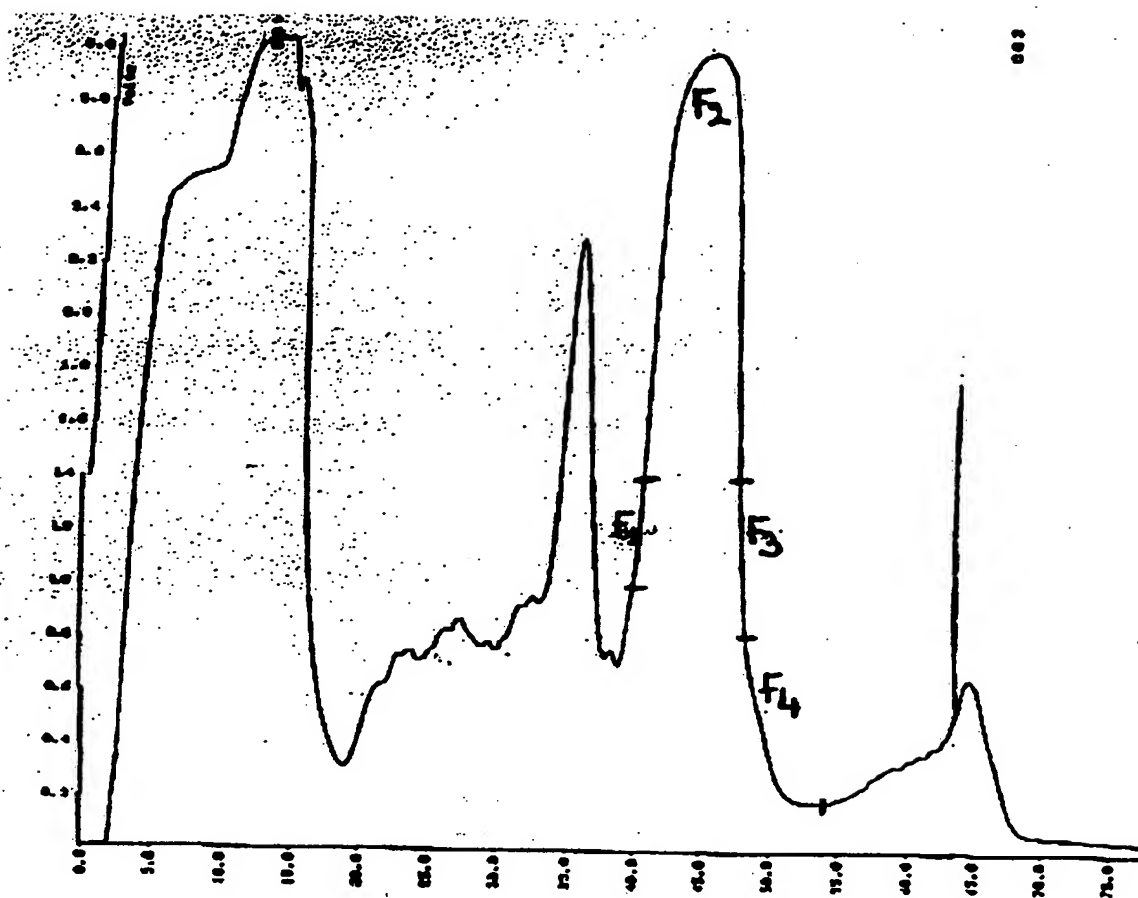


FIGURE 7A

9/17

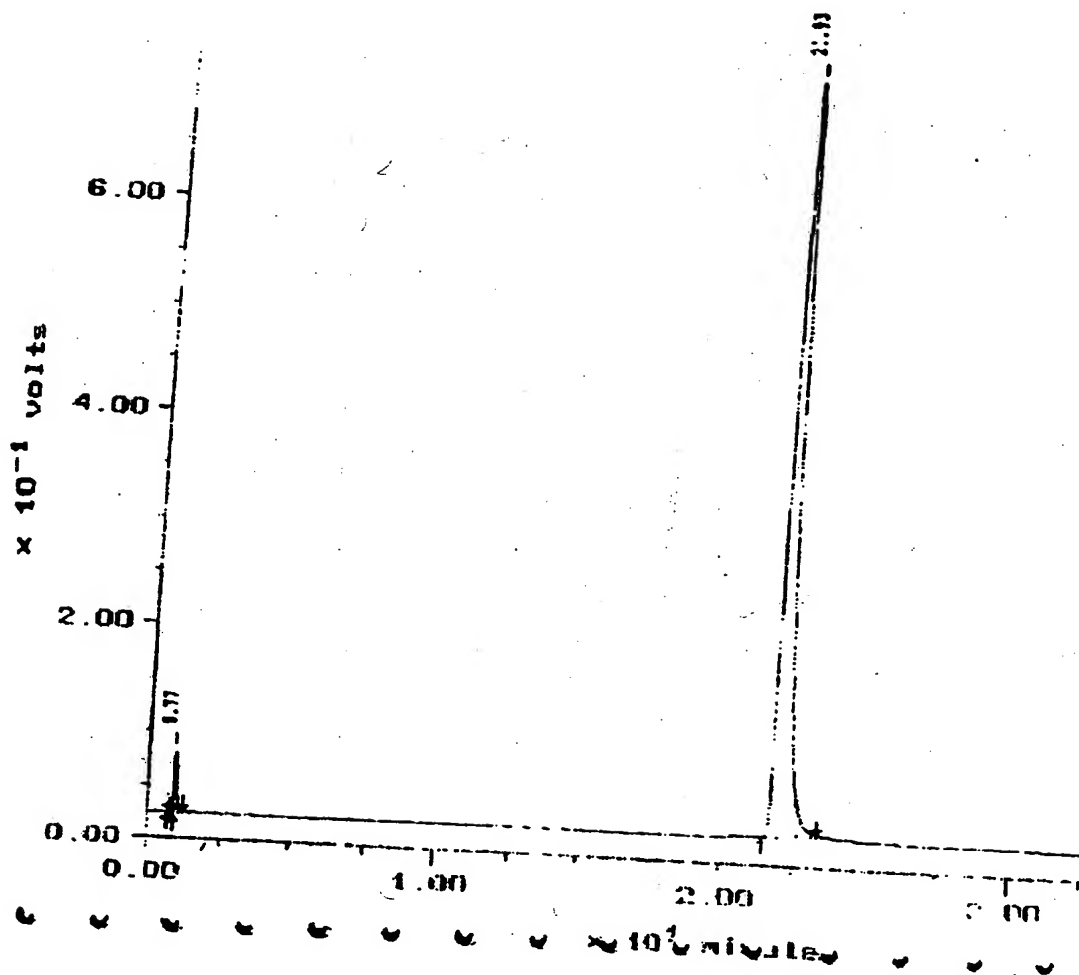


FIGURE 7 B

10/17

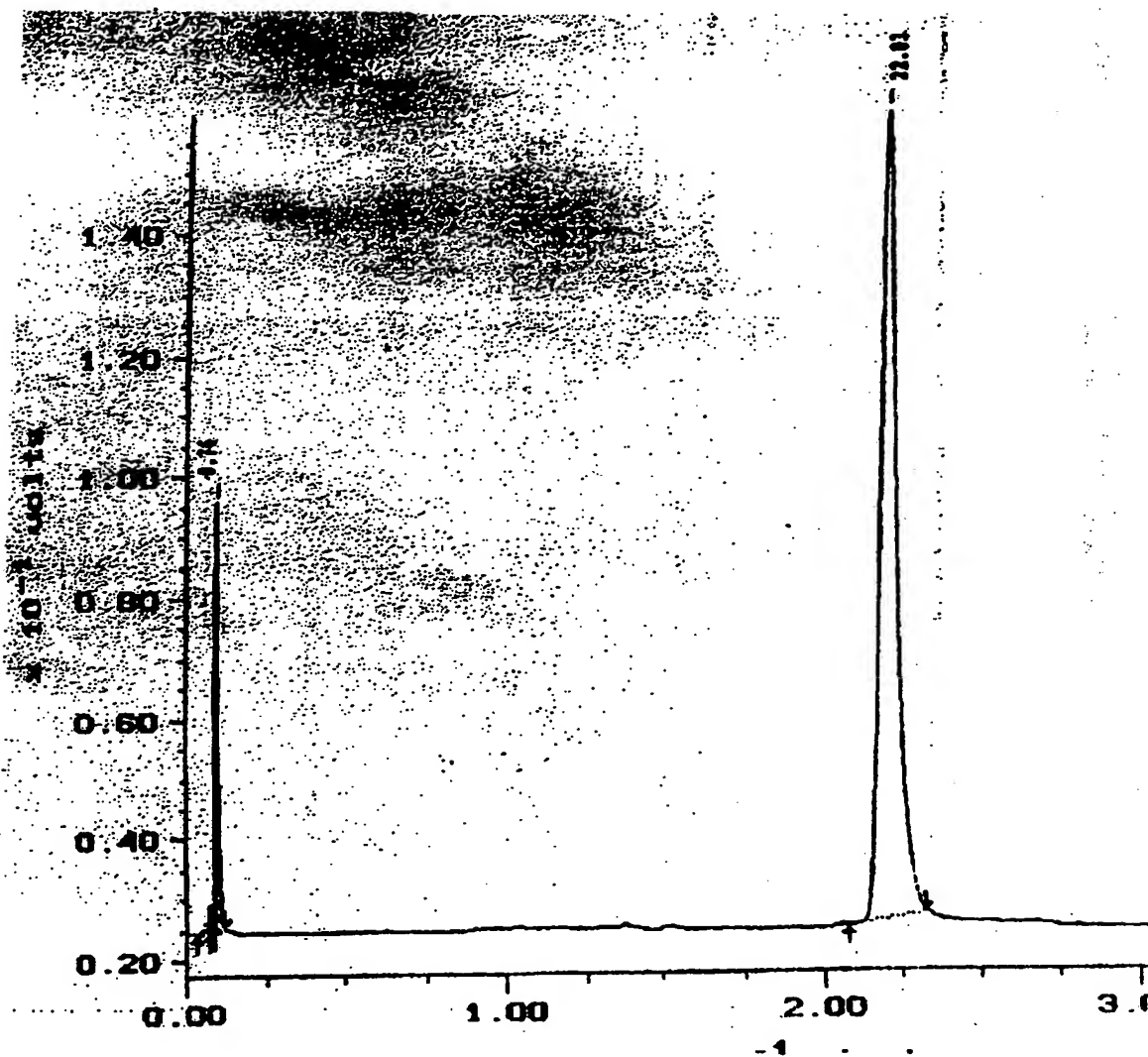


FIGURE 7C

11/17

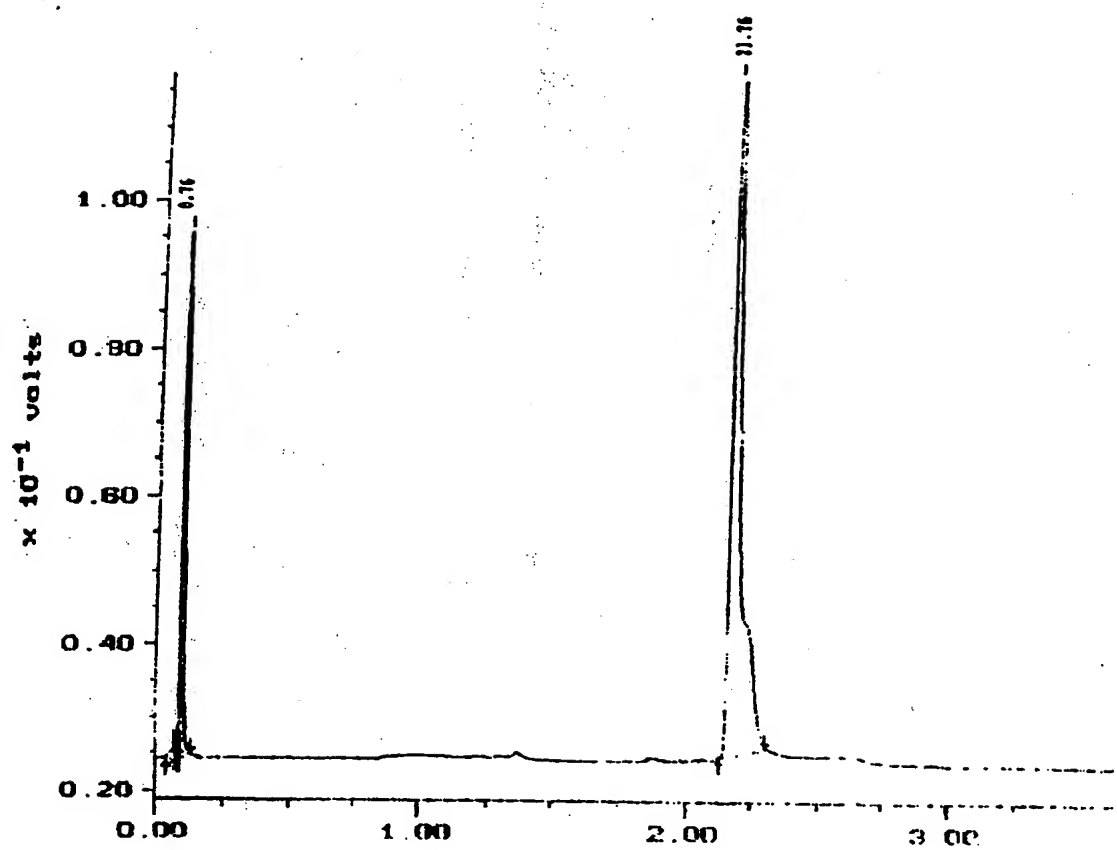


FIGURE 7D

12/17

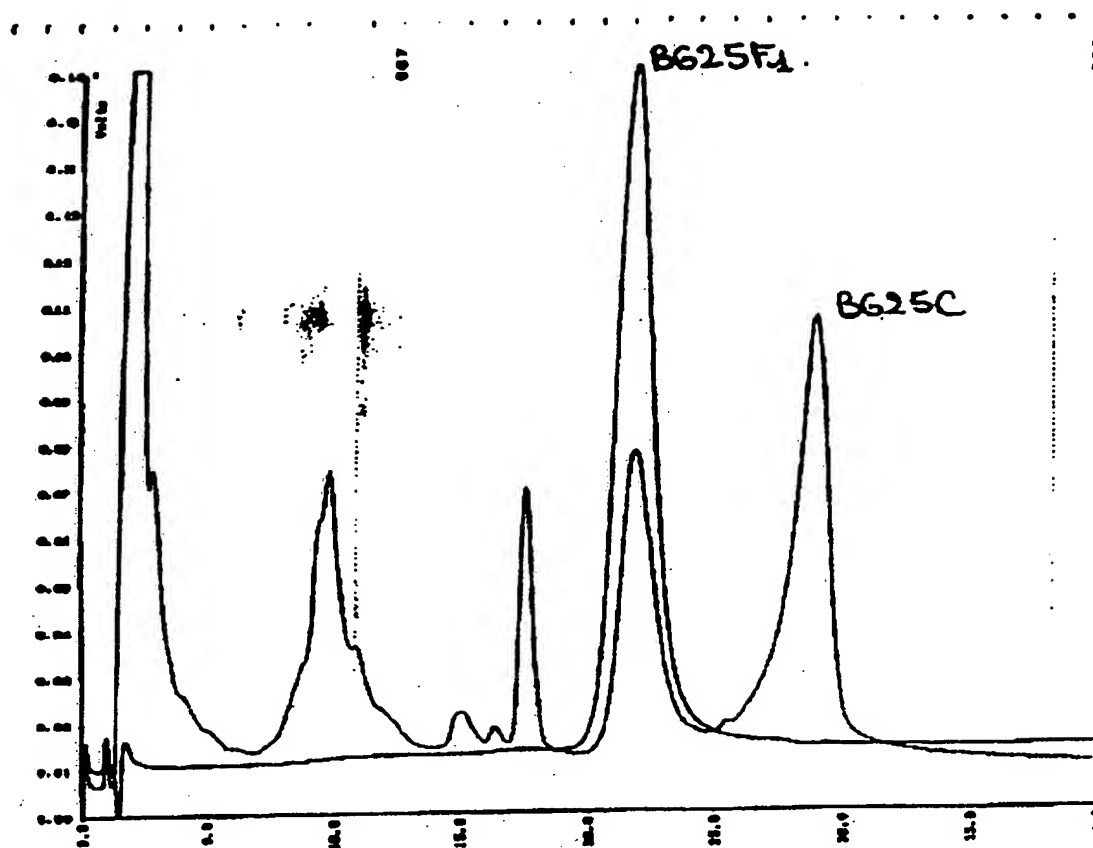


FIGURE 8

13/17

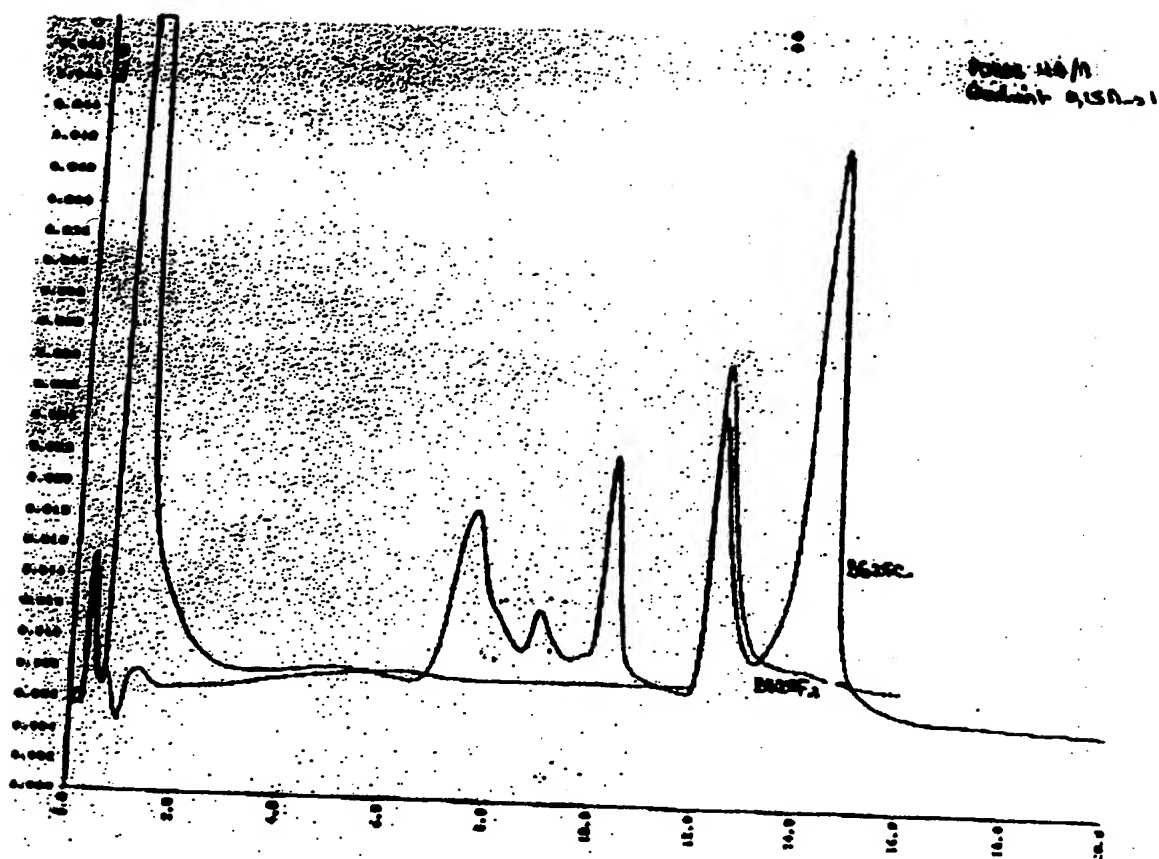
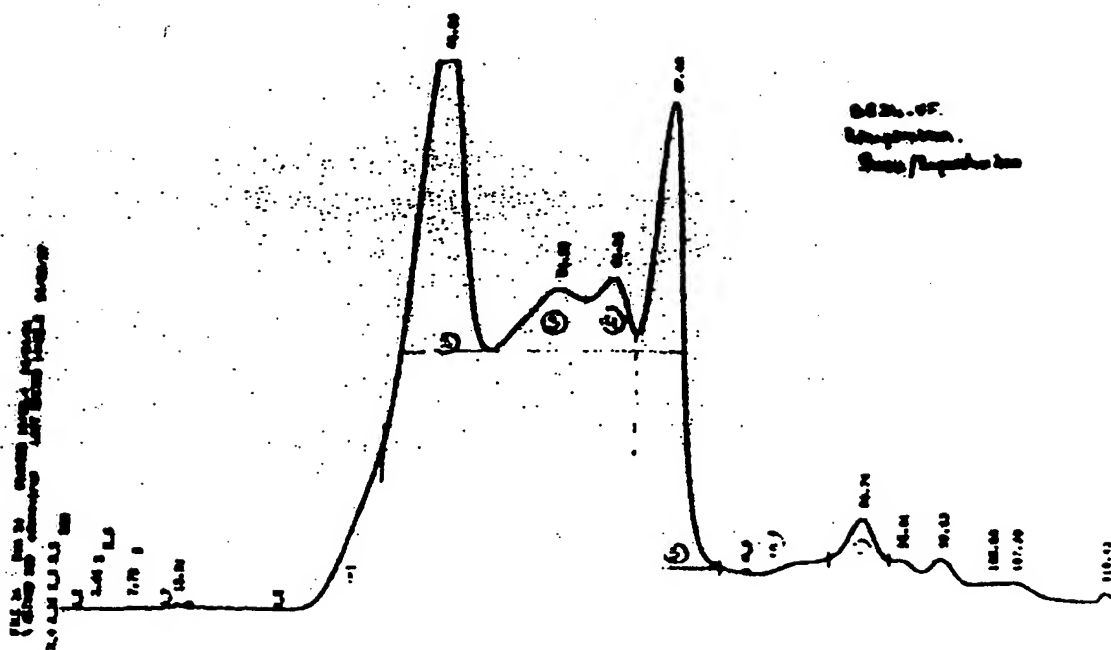


FIGURE 9

14/17



15/17

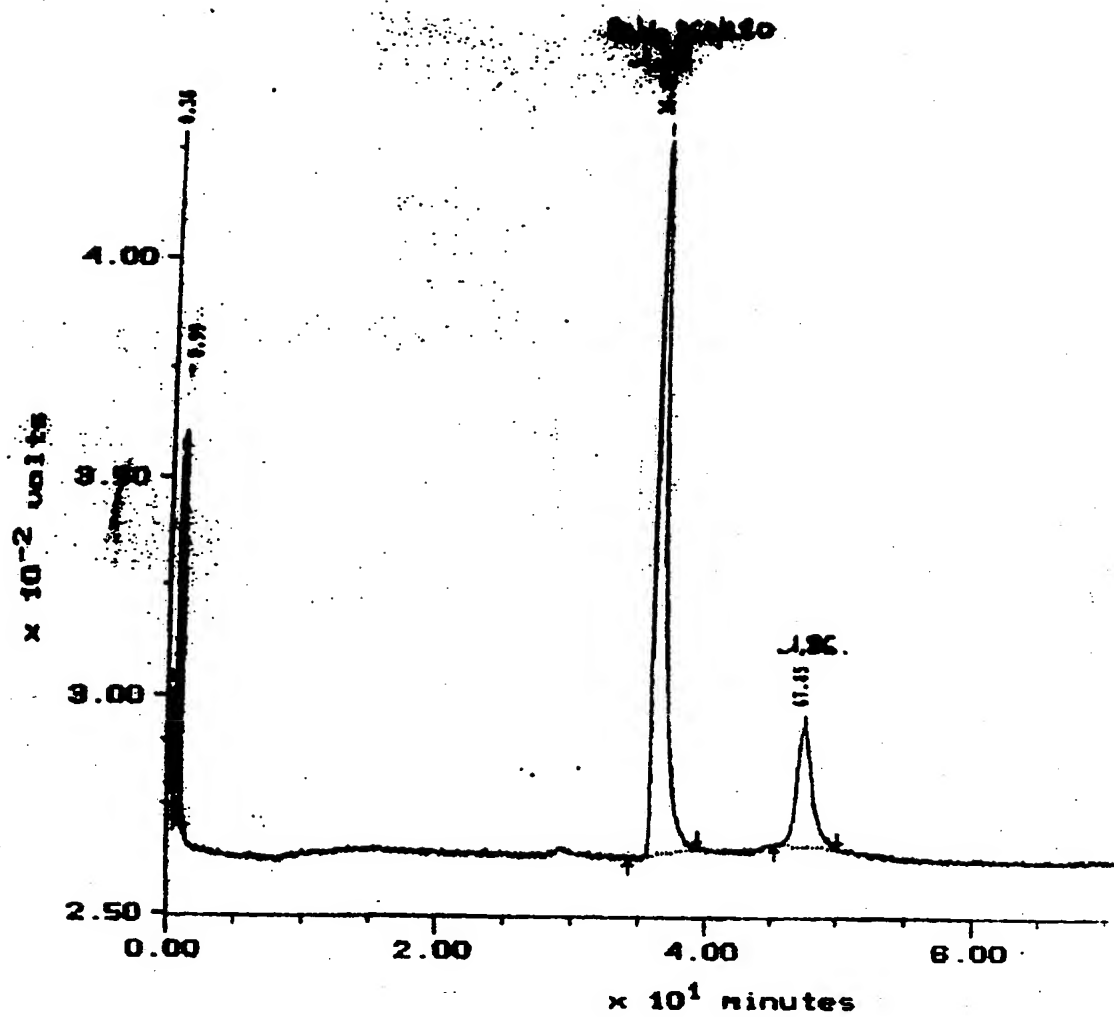


FIGURE 11

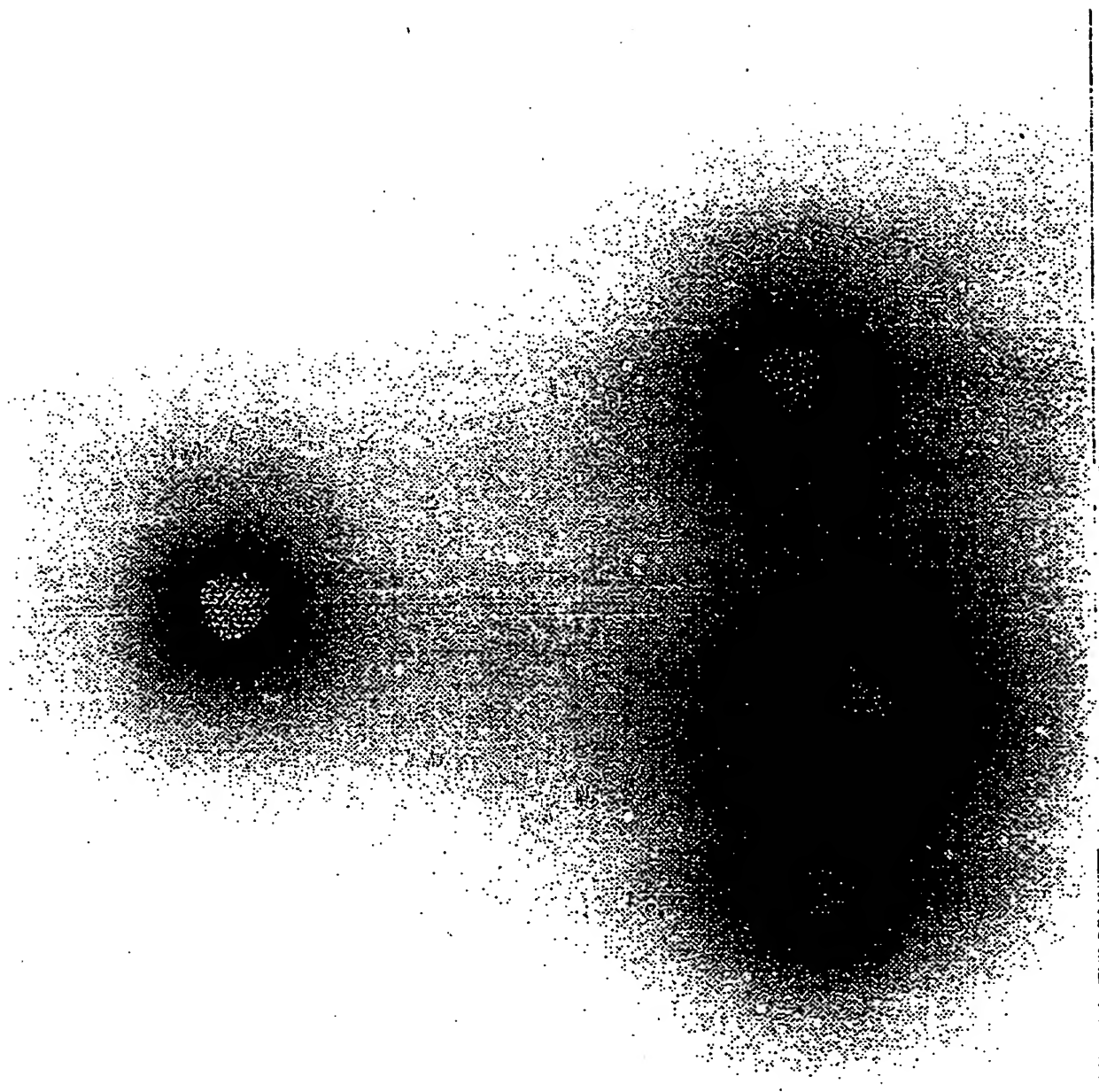


Figure 11



Figure 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 97/01107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N7/02 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, 1995, NEW YORK, US, pages 1403-1416, XP000196636 B. G. HUYGHE ET AL.: "Purification of a type 5 recombinant adenovirus encoding human p53 by column chromatography" cited in the application see the whole document	1-4, 19, 20
A		8-12, 15-18, 21, 23-26, 29
A	WO 95 19427 A (GENETIC THERAPY INC) 20 July 1995 see abstract see page 3, paragraph 4 - page 4, paragraph 1	1-7, 19, 27, 28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 September 1997

Date of mailing of the international search report

22.10.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fac. (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No
PCT/FR 97/01107

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIO/TECHNOLOGY, vol. 11, no. 2, 1993, BASINGSTOKE, GB, pages 173-178, XP000195205 P.F. O'NEIL AND E.S. BALKOVIC: "Virus harvesting and affinity-based liquid chromatography. A method for virus concentration and purification" see the whole document ---</p>	1-19
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 15, no. 2, 1975, BALTIMORE, MD, US, pages 348-354, XP000197079 P.C. VAN DER VLIET: "Thermolabile DNA-binding proteins from cells infected with a temperature-sensitive mutant of adenovirus defective in viral DNA synthesis" see the whole document ---</p>	1-4, 19, 20
A	<p>WO 94 28152 A (TRANSGENE SA) 8 December 1994 cited in the application see page 14, line 25-34 ---</p>	15-18
A	<p>WO 95 25789 A (THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION) 28 September 1995 see page 4, line 10-37 see page 12, line 2-19 see page 16, line 4 - page 17, line 7 ---</p>	1-14, 19-29
A	<p>WO 95 23867 A (RHONE POULENC RORER SA) 8 September 1995 see abstract see page 22, line 17-20 -----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01107

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9519427 A	20-07-95	CA 2181066 A EP 0738319 A US 5648251 A US 5661022 A	20-07-95 23-10-96 15-07-97 26-08-97
WO 9428152 A	08-12-94	FR 2705686 A AU 6850394 A CA 2141212 A EP 0652968 A JP 7509616 T	02-12-94 20-12-94 08-12-94 17-05-95 26-10-95
WO 9525789 A	28-09-95	AU 2127395 A CA 2186034 A EP 0751988 A US 5661023 A	09-10-95 28-09-95 08-01-97 26-08-97
WO 9523867 A	08-09-95	FR 2716893 A AU 1852695 A CA 2184113 A EP 0748385 A ZA 9501803 A	08-09-95 18-09-95 08-09-95 18-12-96 09-01-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De ... de Internationale No

PCT/FR 97/01107

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N7/02 C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, 1995, NEW YORK, US, pages 1403-1416, XP000196636 B. G. HUYGHE ET AL.: "Purification of a type 5 recombinant adenovirus encoding human p53 by column chromatography" cité dans la demande voir le document en entier	1-4, 19, 20
A		8-12, 15-18, 21, 23-26, 29
A	WO 95 19427 A (GENETIC THERAPY INC) 20 Juillet 1995 voir abrégé voir page 3, alinéa 4 - page 4, alinéa 1 --- -/-	1-7, 19, 27, 28

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *a* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 Septembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22.10.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Je Internationale No
PCT/FR 97/01107

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BIO/TECHNOLOGY, vol. 11, no. 2, 1993, BASINGSTOKE, GB, pages 173-178, XP000195205 P.F. O'NEIL AND E.S. BALKOVIC: "Virus harvesting and affinity-based liquid chromatography. A method for virus concentration and purification" voir le document en entier ---</p>	1-19
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 15, no. 2, 1975, BALTIMORE, MD, US, pages 348-354, XP000197079 P.C. VAN DER VLIET: "Thermolabile DNA-binding proteins from cells infected with a temperature-sensitive mutant of adenovirus defective in viral DNA synthesis" voir le document en entier ---</p>	1-4, 19, 20
A	<p>WO 94 28152 A (TRANSGENE SA) 8 Décembre 1994 cité dans la demande voir page 14, ligne 25-34 ---</p>	15-18
A	<p>WO 95 25789 A (THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION) 28 Septembre 1995 voir page 4, ligne 10-37 voir page 12, ligne 2-19 voir page 16, ligne 4 - page 17, ligne 7 ---</p>	1-14, 19-29
A	<p>WO 95 23867 A (RHONE POULENC RORER SA) 8 Septembre 1995 voir abrégé voir page 22, ligne 17-20 -----</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Internationale No
PCT/FR 97/01107

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9519427 A	20-07-95	CA 2181066 A	20-07-95
		EP 0738319 A	23-10-96
		US 5648251 A	15-07-97
		US 5661022 A	26-08-97

WO 9428152 A	08-12-94	FR 2705686 A	02-12-94
		AU 6850394 A	20-12-94
		CA 2141212 A	08-12-94
		EP 0652968 A	17-05-95
		JP 7509616 T	26-10-95

WO 9525789 A	28-09-95	AU 2127395 A	09-10-95
		CA 2186034 A	28-09-95
		EP 0751988 A	08-01-97
		US 5661023 A	26-08-97

WO 9523867 A	08-09-95	FR 2716893 A	08-09-95
		AU 1852695 A	18-09-95
		CA 2184113 A	08-09-95
		EP 0748385 A	18-12-96
		ZA 9501803 A	09-01-96
